

VIRAL (HIV) GROWTH INHIBITION

Patent Number: WO9202228
Publication date: 1992-02-20
Inventor(s): GAIT MICHAEL JOHN (GB); KARN JONATHAN (GB); DINGWALL COLIN (GB); HEAPHY SHAUN (GB)
Applicant(s): MEDICAL RES COUNCIL (GB)
Requested Patent: ☐ WO9202228
Application Number: WO1991GB01321 19910802
Priority Number(s): GB19900016973 19900802
IPC Classification: A61K31/70; C12Q1/70; G01N33/52; G01N33/569
EC Classification: C12Q1/68A8, A61K31/70C, C12Q1/70B2B, C07K14/16, C12N15/67
Equivalents: ☐ EP0542822 (WO9202228), JP3330595B2, JP6500012T
Cited Documents: EP0386563

Abstract

A synthetic molecule comprises at least one oligonucleotide comprising an RNA binding sequence or sequences corresponding to the site bound by the HIV protein tat and capable of binding to tat within cells. The binding sequence or sequences, by binding tat within cells, can act to cause inhibition of growth of any HIV present in the cells, and so has potential therapeutic use in treatment of patients infected with HIV. The invention also provides an assay for identifying compounds that inhibit tat binding.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-500012

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成6年(1994)1月6日

(51) Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/49	Z N A		
A 6 1 K 31/70	A D Y	8314-4C	
48/00		8314-4C	
C 1 2 Q 1/68	Z	7823-4B	
		8931-4B	
		C 1 2 N 15/00	A
	審査請求	未請求	予備審査請求 有 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平3-513229
(86) (22) 出願日 平成3年(1991)8月2日
(85) 翻訳文提出日 平成5年(1993)2月2日
(86) 国際出願番号 PCT/GB91/01321
(87) 国際公開番号 WO92/02228
(87) 国際公開日 平成4年(1992)2月20日
(31) 優先権主張番号 9016973.1
(32) 優先日 1990年8月2日
(33) 優先権主張国 イギリス (GB)
(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, NL, SE), JP, US

(71) 出願人 メディカル・リサーチ・カウンシル
イギリス、ダブリュ・1・エヌ 4・エイ・エル、ロンドン、パーク・クレッセント、20
(72) 発明者 カーン、ジョナサン
イギリス、シィ・ビィ・2 5・エイチ・ジェイ、ケンブス、リトル・シェルフォード、ホークストン・ロード、53
(72) 発明者 ゲイト、マイケル・ジョーン
イギリス、シィ・ビィ・1 4・ジェイ・ビィ、ケンブリッジ、フォレスト・ロード、16
(74) 代理人 弁理士 深見 久郎 (外3名)
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウィルス (HIV) 増殖抑制

(57) 【要約】

合成分子はHIVタンパク質tatによって結合され、細胞内でのtatへの結合が可能な部位に対応する単数または複数のRNA結合配列を含む少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む。単数または複数の結合配列は、細胞内でtatを結合することによって、細胞に存在する任意のHIVの増殖の抑制を生じるように作用することが可能であり、それでHIVに感染した患者の治療における潜在的な治療的用途を有する。この発明はまたtat結合を抑制する化合物を識別するための検定を提供する。

請求の範囲

1. HIVタンパク質tatによって結合される部位に対応する1つまたは複数のRNA結合配列を含み、かつ細胞内においてtatへ結合することが可能な少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む合成分子。
2. HIVタンパク質tatによって結合される部位に対応する1つまたは複数のRNA結合配列を含み、かつ細胞内においてtatへ結合することが可能な少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む合成分子を含む薬学的組成物。
3. HIVに感染した患者の治療に使用するための合成分子であって、この分子はHIVタンパク質tatによって結合される部位に対応する1つまたは複数のRNA結合配列を含み、かつ細胞内においてtatへの結合が可能な少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む合成分子。
4. 細胞内のHIVの増殖を抑制するための薬剤の製造における、HIVタンパク質tatによって結合される部位に対応する1つまたは複数のRNA結合配列を含み、かつ細胞内においてtatへの結合が可能な少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む合成分子の使用。
5. 細胞内のHIVウィルスの増殖を抑制する方法であって、請求項1に従った分子、または請求項3に従った薬学的組成物を細胞へ投与するステップを含む、方法。
6. HIVに感染した患者の治療方法であって、請求項

1に従った分子または請求項3に従った薬学的組成物を患者に投与するステップを含む、方法。

7. TAR RNAへのtatプロテインの結合を抑制する化合物を同定するための検定であって、化合物をtatプロテインおよび請求項1に従った分子と反応させることと、その分子へのtatの結合度を測定することを含む、検定。

8. 合成分子は長さにおいて20個の残基より長くないオリゴヌクレオチドからなる、前述の請求項のいずれか1つに記載の発明。

9. オリゴヌクレオチドは、HIV TAR RNAの配列におけるU₂₅に対応するウリジン残基を含む3つの不対残基を含むと共に、HIV TAR RNA配列におけるG₂₅-G₃₅に対応するフランキング塩基対を含む、前述の請求項のいずれか1つに記載の発明。

10. RNA結合配列はDNA基底配列に組込まれる、前述の請求項のいずれか1つに記載の発明。

11. その、または各オリゴヌクレオチドは、天然に存在するオリゴヌクレオチドであるか、修飾された塩基および/もしくは糖ならびに/または結合を有するオリゴヌクレオチドのような構造的に関連した変形物である、前述の請求項のいずれか1つに記載の発明。

12. その、または各オリゴヌクレオチドは1つ、またはそれより多い4'-チオ-2'-デオキシシチジン残基の

包含によって修飾される、前述の請求項のいずれか1つに記載の発明。

明細書

名称: ウィルス (HIV) 増殖抑制

発明の分野

この発明は細胞内のウィルス増殖の抑制の方法およびそれにおける使用のための組成物に関するものである。特定的には、この発明はヒト免疫不全ウィルス (HIV) の増殖抑制に関するものである。

発明の背景

ウィルス複製中のHIVゲノムの転写は明確な動力学的状態を示す (参考文献53、59、60、79を参照)。HIV遺伝子発現の初期生産物は短く、長さ約1.8ないし2.0kbのスプライシングされたmRNAを増殖し、これはトランス作用性調節タンパク質tat、rev (およびおそらくnef) をコードする。ウィルスによる感染が進み、tatおよびrevタンパク質のレベルが感染された細胞において上昇するに伴い、mRNA生産はenvやvifおよびvprのような他のHIV遺伝子生産物をコードする単独にスプライシングされた4.3kb mRNAの系統群の生産へ徐々に移行する。最後に感染過程の末期において生産は全長のスプライシングされていない転写へ切り替わり、これはウィルス粒子RNAとしても、gag-polポリプロテインのためのmRNAとしても作用する。

この遺伝子発現制御を達成するために、HIVウィルス

は細胞性でかつウィルスによりコードされたトランス作用性因子とシス作用性ウィルス調節配列 (cis-acting viral regulatory sequences) との相互作用に依存する (1, 3, 5, 3)。転写の開始はウィルスのLTR (long terminal repeat) における細胞性転写因子のための結合部の存在に大きく依存する (2, 8)。対照して、ウィルスによりコードされた調節タンパク質tatおよびrevはHIVメッセンジャーRNA内のコードされたシス作用性配列によってそれらの活性を働かせる。トランス活性化応答領域 (TAR) はtat活性に必要とされ、ウィルスのLTRにおいて残基+1および+79の間に位置決めされる (5, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 27, 28)。rev応答エレメント (RRE) はenv遺伝子内において234ヌクレオチド長配列へ局在されている (47, 51, 54, 65, 67, 68, 77)。類似の調節タンパク質および類似の配列がHIV-2およびSIVによって使用される (8, 66)。HTLV-ウィルスrex遺伝子生産物はrevに類似して機能すると思われ、かつrevと機能的に置換してウィルス遺伝子発現を促進し得る (76)。

HIV転写の明確な動力学的状態は調節タンパク質tatおよびrevの細胞内レベルを反映すると現在考えられている。まず、宿主転写因子のLTRへの結合はtatを含む初期mRNAの基底レベル転写を誘導する。tatレ

ベルが上昇するに伴い、LTRからの増加された転写はトランス活性化機構によって刺激される。これによってtatレベルはさらに上昇し、revの生産もまた刺激される。ウィルス構造タンパク質の生産は、revレベルがひとたびrev応答エレメント (RRE) 配列を運ぶメッセンジャーRNAの移出を促進するのに十分に高いレベルに達すると始まる。HIV増殖周期は、ウィルスLTRからの転写が溶菌増殖サイクルを開始するのに不十分な量の調節タンパク質しか生産しないためにウィルス増殖発現が活動していない潜伏段階も含むかもしれない。

HIV遺伝子発現の著しいレベルはtatタンパク質の存在においてのみ達成される。まず、tat活性がウィルスLTRにおける配列への宿主転写因子の結合を刺激するか、または転写因子そのものとして作用するかのいずれかによって転写開始速度を増加したことが最も起こり得ると思われた (1, 3, 5, 3)。しかし、いくつかの実験はtat活性がDNA模範配列よりむしろRNA模範配列を必要とすることを強く示唆する。

ウィルスLTRの欠失分析は、tat活性がトランス活性化応答領域 (TAR) と呼ばれる、残基+1と+79との間のすべてのmRNA転写物の5'末端において転写の開始部位の下流に位置決めされる調節エレメントを必要とすることを示した (5, 10, 11, 27, 28)。転写された領域におけるTARの配置は意外なものであった、

それはこの配置がそれがDNAエレメントよりむしろRNAとして機能し得ることを示唆したからである。この考えは、エンハンサエレメントとは異なりTARエレメントがHIVプロモータへの3'に、かつ正しい配向および位置に位置付けられているときのみ機能的であるという観察によって支持された (5, 12-15)。さらに、TAR RNA配列は高度に安定したヌクレアーゼ抵抗性のステムループ構造を形成し、塩基対合を分断することによってTARシステムを脱安定化する点変異が通常tatによって刺激された転写を終らせる (88)。

バックハウト (Backbait) ら (18) は、TAR RNA配列がトランス活性化が生じるために核内で転写され、かつ正しく折り畳まれねばならないという説得力のある証拠を与えた。彼らはTARの上流または下流のいずれかのTAR RNAヘアピンループ構造の形成を脱安定化するようにデザインされたアンチセンス配列を導入した。TARの正しい折り畳みおよびトランス活性化はいずれも、この脱安定化配列がTARの5'側に位置付けられたとき遮断されたが、TARの3'側における同一配列の位置付けは正常なトランス活性化を許容した。このことはTARヘアピンループ構造が未完成の転写物上で折り畳み、かつ活性になり得ることを強く示唆した。

トランス活性化は上流のプロモータエレメントへのDNA結合タンパク質のtat調節によるものではないと思わ

れる (17)、それはSpl部位の上流で切って軽くされたか (18)、または異種構造のプロモータへ融合された (5, 19, 20) ウィルスLTRがトランス活性化されるであろうからである。

tat発現細胞において、ハイブリッド形成によって測定されたようなmRNAレベルと、一連の実験によって測定されたような核転写速度とはいずれも7ないし40倍に増加される (88, 89)。tatがTARを運ぶmRNAの翻訳効率も増加し得るかどうかに関してはかなりの競争があったが、tatによって促進されたmRNA合成の増加はトランス活性化の理由を説明するのに十分であるということが現在は明らかであるように思われる。形質移入された細胞におけるCAT mRNAおよびCATタンパク質レベルの双方の的確な測定は、タンパク質が広範囲にわたってmRNAに並行して蓄積したことを示す。CAT mRNAの極めて低いレベルでは、メッセージの高いレベルにおけるよりも転写効率が低い。しかしRNA使用におけるこの増加はtat特異的ではない、それはアデノウイルスE1Aタンパク質による転写の刺激後のようなmRNAレベルのいかなる上昇も翻訳に対応の影響を生ずるからである (89)。

tatによるTAR含有mRNAの翻訳制御が活性であると報告された事例はアフリカツメガエルの酵母細胞における場合である。TAR配列を運ぶCAT mRNAはア

フリカツメガエルの卵母細胞の細胞質に注入されるときは翻訳されないが、tatプロテインとともに核内にmRNAを同時注入した後に翻訳は回復される(90)。この現象はフリカツメガエルにおける特殊機構の反映であり得た、すなわちtatによる翻訳制御はHIV増殖を許容する哺乳類細胞において平行マイクロインジェクション実験が行なわれたとき証明されることができなかった(91)。フリカツメガエルの実験において観察された翻訳遮断が細菌性RNAポリメラーゼによる生体外の転写中に生産された二重鎖RNAフラグメントによるmRNA調製物の混入によるものであることもあり得る。哺乳類細胞の産物の翻訳系において、TAR含有mRNAはTAR配列が二重鎖RNA依存性キナーゼを活性化したと思われるためにうまく翻訳されなかったことが報告された(92)。しかしセルロースカラムにおけるクロマトグラフィーによるTAR含有RNA調製物の再精製後、混入二重鎖RNAは除去され、TAR含有mRNA調製物は正常に翻訳された(93)。

TAR配列を運ぶプロモーターからの転写を刺激するtatの能力に関する最も簡単な説明は、tatが直接結合によってTAR RNAを認識するというものであるが、この相互作用の証明は困難であると判明した。TAR RNAへのtatの特異的結合を証明する初期の試みは、おそろくうまく行なわれなかった、なぜならば、RNA混入物

がなく、かつ凝集物がその7つのシステイン残基の酸化のため形成されない条件下にあるE. coliにおいて発現されたtatを精製することが困難であるからである。しかし改良された方法を使用して我々はtatがTAR RNAを特異的に認識できるということを証明できた。結合は高い親和力($K_d = 12 \text{ nM}$)を示し、tatはTAR RNAとの1対1複合体を形成する(94)。

TARのtat認識は緊密なフランキング塩基対と同様TAR RNAステムの頂端近くのUの豊富なバルジの存在のみを必要とする。Uの豊富なバルジの配列を変える変異、またはTARステムループ構造の近くの残基における塩基対合を分断することによってUの豊富なバルジの構造に影響を与える変異は、tat結合およびトランス活性化をいずれも終らせる(10、11、27、28)。対照すると、TARステム全体の塩基対の多くのものの同一性はワトソン-クリック塩基対合が維持される限り、トランス活性化、またはtat結合のための重要な必要条件であるとは思われない。tatによるRNA結合はtatにおけるアルギニン残基とTAR RNAにおけるリン酸塩との間の特異的な塩橋の形成を必然的に伴う。tatからアルギニンの多い配列を運ぶC末端ペプチドは、無傷タンパク質より低い特異性および親和力で結合するが、Uの豊富なバルジでTAR RNAへ結合することもできる(95、96)。

tatおよび外因性RNA結合ドメインを含有するハイブリッドタンパク質を使用する実験は、tatがTAR RNAエレメントを運ぶ未完成転写物へ直接結合した後転写機構へ与えられるという生化学的証拠を支持する興味深い遺伝的証拠を提示した(97、98)。たとえば、tatからの配列を含む融合タンパク質およびバクテリオファージR17コートタンパク質は、TAR RNA配列がR17オベレート配列を運ぶRNAステムループ構造によって完全に置換えられるとき、HIV LTRからの転写を刺激し得る。TAR RNAのtat認識の場合におけるように、コートタンパク質に関してその親和力を低下するR17 RNAオベレート配列の変異が生体内のtatR17融合プロテインによるトランス活性化を対応して低下させるため、結合は直接であると思われる(98)。

TAR RNAへの結合後tatはいかにして遺伝子発現を調節するのであろうか。1つの初期の示唆は、TARが転写因子のための付加的模範部位として作用することによって転写開始速度を刺激するように作用するというものであった。除外することは難しいが、このモデルはますますあり得ないものに思われる、それは酵母GAL-4結合ドメインを含む融合タンパク質のための結合部位のみを含むプロモーターを含むハイブリッドプロモーターがtatに対して高い応答性があるからである。転写開始に影響を与えるRNA結合タンパク質の既知の例はないが、一方転写伸

長を制御するバクテリオファージ・ラムダNタンパク質のようなRNA結合タンパク質の原核生物系には多くの良い例があることも注目されるべきである。

ピーターリン(Pettilä)らはtatがTAR部位またはその近くにおける伸長に対する阻止の克服を助ける抗ターミネーターとして作用するという重要な示唆を与えた(38、40、98)。彼らの提案は短い、早期に終了したRNA転写物がtatが存在しないと蓄積するという観察に基づく。しかしTARは単に抗終結部位ではない、それはトランス活性化またはTARの欠失を終了させるTARの変異の結果、LTR発現は構造的に高いレベルにならず、短いRNA転写物を「追跡」して、全長のmRNAにすることが困難であるからである。

TARの下流における特異的ターミネーター配列の同定の失敗によって、tatがRNAポリメラーゼIIのためのより一般的な伸長因子として作用し、単に部位特異的抗終結因子としては作用しないという第3の提案が行なわれた。TARを含有する不完全な転写物上に存在するタンパク質結合部位によって媒介された反応における転写開始直後に、tatおよび細胞の補助因子がRNAポリメラーゼIIとともに集まることがあり得るように思われる。この修飾された転写複合体は次にTARを含む様々な遠位部位において伸長への付加的阻止を克服することによってウィルスmRNA生産を刺激する。

伸長因子モデルのための強い支持が核の追加実験から得られる。tatが存在しない場合、RNAポリメラーゼはウィルスLTRまたはその近くにおいてのみ見出され得る。しかし、プロモータの下流のRNAポリメラーゼの密度はtatが存在する場合、劇的に増加する(89)。しかし、伸長依存性機構の厳密な論証にはtatに应答する有効な細胞遊離転写系の発達が必要とされるであろう。これらが間もなく利用可能になるであろうという動みになる徴候がある。HIV感染された細胞からの抽出物の添加はウィルスLTRからの転写を刺激する(100)。細菌により合成されたtatが生体外で転写を刺激し得るという最近の報告もあった。不運にも組換tatによる転写の刺激は高濃度の添加タンパク質でインキュベーションを引伸ばした後にのみ最もよく観察される(101)。したがって真性のトランス活性化が生体外で再生されたかどうかは不明瞭なままであり、細胞遊離系の付加的発達は機構的研究が開始し得る前に必要とされるであろう。

この発明の目的は、ウィルス増殖サイクルにおいて調節タンパク質tatの活性を修飾することを伴う、細胞内のHIVウィルス増殖の抑制のための有効な方法、およびそこにおいて使用するための組成物、ならびに潜在する抗ウィルス因子をスクリーニングするための検定を提供することである。

発明の説明

領域のみがtatプロテインを結合するために決定的であるという予期せざる発見に基づく。したがって細胞内への同化が可能に十分小さい、この特定の結合部位の薬学的に許容可能な核酸、または他の類似体(化学的、または酵素的に)合成することが合理的に実用性がある。

これらの類似体は次に細胞内のtatプロテイン活性の競合抑制因子として使用され得る、すなわちTAR類似体とのその反応を介して細胞中に存在するtatを除去することによって、それらの細胞におけるウィルス増殖が効果的に抑制され得る。

tat結合は、HIVのTAR RNA構造におけるステムの頂端の近くにバルジを形成する、1つのウリジン(U)残基を含む3つの不対残基の存在に依存するようであることがわかっている。tat結合はtat結合部位の一部も形成するフランキング塩基対の存在にも依存する。この結合部位におけるある変異体は生体外においてtatを結合することも、生体内においてトランス活性化することもできない。それゆえこの小領域(高親和性結合部位であることがわかっている)を含む核酸、または他の類似体はTAR配列において見出される構成をまね、tatプロテインへ結合することができる。

したがって、この発明のオリゴヌクレオチドにおける結合配列は好ましくは、tatプロテインの認識部位とともに形成するHIVのTAR RNAの配列におけるG₂a

この発明の第1の局面に従って、HIVタンパク質tatによって結合される部位に対応する1つのまたは複数のRNA結合配列を含み、かつ細胞内のtatへ結合することが可能な少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む合成分子が提供される。

細胞内でtatを結合することによって、1つまたは複数の結合配列は細胞内に存在するいかなるHIVの増殖も抑制するように作用し得、HIVに感染した患者の処置における潜在的治療にも使用される。

この発明の第2の局面に従って、この発明の第1の局面によって提供されるような分子を含む薬学的組成物が提供される。薬学的組成物は細胞内のHIVの増殖抑制因子として便宜的に使用される。

この発明の第3の局面に従って、HIVに感染した患者の治療における使用のための合成分子が提供され、この分子はHIVタンパク質tatによって結合される部位に対応する、1つまたは複数のRNA結合配列を含み、かつ細胞内でtatに結合することが可能な少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む。

この発明の第4の局面にしたがって、細胞内のHIVの増殖を抑制するための薬剤の製造において、この発明の第1の局面によって提供されるような分子の使用が提供される。

この発明は、TAR配列の極めて小さく、かつ特異的な

-C₂aに対応するフランキング塩基対と共に、HIVのTAR RNAの配列におけるU₂aに対応するウリジン残基を含む3つの不対残基を含む。

このようなTARの小領域が実際にtatを結合するために必要とされるので、好ましくは(しかしこれに限定されない)20個以下の残基の、治療的に有効な長さのオリゴヌクレオチドからなる結合部位の類似体が構成され得る。このような分子は感染された細胞に入り得る可能性が高く、それゆえより長さの長いものよりもHIV感染の生体内治療のための製薬に使用され得る。この発明に従った分子は、HIVウィルスに感染された細胞内への組換えを容易にするために、好ましくは長さにおいて20個以下の残基のオリゴヌクレオチドの形である。

RNAそれ自体が細胞内で代謝的に不安定なため、この発明に使用されるオリゴヌクレオチドは好ましくは細胞内におけるその安定性を増加させるようにある程度修飾される。必然的にRNA配列である結合配列はたとえばDNA塩基配列か、または他の構造的に関連した種々のオリゴヌクレオチドに組込まれてもよく、この塩基配列は全体としてオリゴヌクレオチドへ必要な代謝的安定性を与える。

したがって細胞内に導入されるとき、tatによって結合される部位に対応するRNA配列を含むいかなるオリゴヌクレオチド(またはオリゴヌクレオチドの組合わせ)も、tatを結合することが可能であり、したがってそれらの

細胞内におけるウィルス増殖の競合抑制因子として作用することが可能であるべきである。実際に、TAR RNA結合部位におけるt a tへの結合が可能な小分子も、抗ウィルス因子として使用され得、この発明は抗HIV因子としての使用のためのこのような分子をその範囲内に含む。このような分子はTAR RNAのRNA構造の形状をまねし得るか、またはTAR RNAのRNA構造と等価の官能基を含む得る。

オリゴヌクレオチドは細胞のリボヌクレアーゼによる複製に対して感受性であるため、RNA結合配列の作用をまねるがヌクレアーゼ複製に対して感受性の低い化学的に修飾されたオリゴヌクレオチド(またはオリゴヌクレオチドの組合わせ)を競合抑制因子として使用することが好ましいであろう。他の修飾、たとえば結合を高めること、細胞の摂取を高めること、薬理学もしくは薬物動態学を改良すること、または他の薬学的に所望の特性を改良することが要求されてもよい。

オリゴヌクレオチドは天然に存在するオリゴヌクレオチドであるか、修飾された塩基および/もしくは糖ならびに/または結合を有するオリゴヌクレオチドのような構造的に関連した変形物であってもよい。この中で使用される用語「オリゴヌクレオチド」はこのような変形物のすべてを包含すると意図される。

結合部位それ自体か、結合に関与しないオリゴヌクレオ

チドの一部のいずれかへ行なわれるであろう修飾は以下の型を含むであろう(しかしそれらに限定されない)。

a) 骨格の修飾(後の図5を参照)。

i) ホスホロチオエート(XもしくはYもしくはWもしくはZ=SまたはOとして残基を含む2つ以上の組合わせ)

たとえば、Y=S(81)、X=S(49)、YおよびZ=S(45)

ii) メチルホスホネート(たとえばZ=メチル(69))

iii) ホスホルアミデート(Z=N-(アルキル)₂)

たとえば、アルキル=メチル、エチル、ブチル)

(Z=モルホリンまたはピペラジン)(44)

(XまたはW=NH)(64)

iv) ホスホトリエステル(Z=O-アルキル たとえばメチル、エチルなど)(70)

v) リンの存在しない結合(たとえばカルバメート、アセトアミデート、アセテート)(55、56)

b) 糖の修飾

i) 2'-デオキシヌクレオシド(R=H)

ii) 2'-O-メチル化ヌクレオシド(R=OMe)(80)

たとえば

i) コレステロール(63)、ポリアミン(62)、他の可溶性ポリマー(たとえばポリエチレングリコール)

ii) アルファ-ヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチド(72)

g) 修飾a)-f)の組合わせ

4-チオ-2'-デオキシチミジンと置換された残基を含む修飾されたオリゴヌクレオチドを使用する実験は、同等の修飾されないオリゴヌクレオチドよりt a tへうまく結合した。したがって1つまたはそれより多い4-チオ-2'-デオキシチミジン残基の包含によってその、または各オリゴヌクレオチドを修飾することが好ましい。

このような修飾されたオリゴヌクレオチドは「アンチセンス」抑制因子としてデザインされたオリゴヌクレオチドと特徴を共有するが、化合物がセンス鎖配列に対応し、かつ作用機構がタンパク質-核酸相互作用に依存し、核酸配列との相互作用には依存しないという点において全く異なることに注目すべきである。

この発明の分子および薬学的組成物は生体内におけるウィルス増殖の抑制のために使用されるとき、経口的に、静脈経路で、または他の任意の適切な方法によって投与されてもよい。これらは生体外、たとえば生体から取出され、輸血の目的で後に必要とされる血液中の細胞におけるウィルス増殖の抑制に使用されてもよい。

iii) 2'-フッオロ-2'-デオキシヌクレオシド(R=F)(61)

c) 塩基の修飾 (検討のため58を参照)

i) 5の位置で置換された(たとえばメチル、ブロム、フルオロなど)か、またはアミノ基でカルボニル基を置換したピリミジン誘導体(75)

ii) 特定の窒素原子が欠如した(たとえば7-デアザアデニン、ヒポキサンチン)か、または8の位置で官能基が設けられた(たとえば8-アジダアデニン、8-ブロムアデニン)プリン誘導体

d) 反応性官能基に共有結合されたオリゴヌクレオチド

たとえば

i) ソラレン(71)、フェナントリン(82)、マスタード(83)(共同試験の必要性を有する、または有さない不可逆性の架橋結合剤)

ii) アクリジン(挿入剤)(75)

iii) チオール誘導体(タンパク質を含む可逆性ジスルフィド形成)(48)

iv) アルデヒド(シッフ塩基形成)

v) アジド、プロモ基(UV架橋結合)

vi) エリプチセン(ellipticine)(光分解架橋結合)(74)

e) 親油性または細胞による摂取の改良が可能な他の試薬に共有結合されたオリゴヌクレオチド

この発明はさらに細胞内のHIVウィルスの増殖を抑制する方法を提供し、この方法はこの発明に従った分子または薬学的組成物を細胞へ投与するステップを含む。

この発明はHIVに感染した患者の治療方法も提供し、この方法はこの発明に従った分子または薬学的組成物を患者へ投与するステップを含む。

この発明はTAR RNAまたはその合成類似体へのtatプロテインの結合を抑制し、抗ウィルス因子としての潜在的用法も有する化合物を同定するための検定の基礎としても使用され得る。

したがってさらなる局面においてこの発明はTAR RNAへのtatプロテインの結合を抑制する化合物を同定するための検定を提供し、この検定は化合物をtatプロテインおよびこの発明に従った分子と反応させることと、その分子へのtatの結合度を決定することを含む。

分子へのtatの結合度を決定し、これを既知の基準についての結果と比較することによって、その化合物によって生じたtat/TAR結合の抑制の程度(競合的または非競合的)が示され得る。

この検定は好ましくはフィルタ結合検定の形式であるが、ゲル移動度シフト検定、分光検定、捕獲検定などのような別の型の検定であってもよい。

TARへの結合に対して競合する競合分子または非競合的にTARへのtat結合を抑制する分子のような阻害分

子が存在する場合のTAR RNAに対するtatの親和力の正確な測定は、tatプロテインとTAR RNAとの間の化学量論的複合体の形成なしには達成され得ず、これはE. coliからのtatプロテインの精製の、および結合検定を行なうための方法の改良結果として生体外において現在可能である。

tat/TAR結合における抑制効果を有すると同定された化合物は抗ウィルス因子としての可能な使用についてさらに研究され得る。この発明はしたがって潜在的抗ウィルス化合物のスクリーニングを可能にし得る。

この発明は添付の図面を参照して例示によってこれよりより詳細に説明されるであろう。

図1はHIV-1遺伝子発現を制御する遺伝子要素および細胞因子を示す。

図2はRNA結合タンパク質tatおよびrevがいかにしてHIV-1遺伝子発現を制御するかを示す。

図3はtatの生体内活性および生体外結合のために必要とされるHIV-1 TAR RNAにおけるそれらの配列を示す。

図4はtat濃度($\times 10^{-8}$ M)に対するフラクション範囲のグラフであり、TAR RNA中のウリジンの豊富なバルジ(「Uの豊富な泡」)がtat結合に必須であることを示す。

図5は潜在的抗ウィルス活性を示すであろう修飾された

オリゴヌクレオチドの構造を示す。

図6は様々な変異体のTAR RNA配列を使用するゲル遅延tat結合検定の結果を示す。

図7はRNA競合濃度(μ M)に対する 32 P標識HIV-1 TAR RNAのフラクション範囲のグラフの形式で様々な変異体のTAR RNA配列を使用するフィルタ結合検定の結果を示す。

図8はtatについて既知の親和力を有する変異体TAR RNA配列を使用する形質移入実験の結果を示し、プラスミドDNA(μ g)に対するCAT活性(%アセチル化/10 μ l抽出物)のグラフの形式で生体内のトランス活性化におけるTAR変異の影響を示す。

図9aはタンパク質濃度(nM)に対するフラクションRNA範囲の飽和結合曲線を示し、図9bはtat/TAR相互作用の化学量論を決定するために使用されるTARへのtat結合のスキッチャード分析である。

図10は競合RNA(nM)に対するフラクション 32 P標識TAR RNA範囲のグラフであり、TAR RNAと、バルジにおいて配列CUUを運ぶ変異体との間のtat結合のための競合を示す。

図11は図10に類似のグラフであり、TAR RNAとバルジにおいて配列CCCを運ぶ変異体との間のtat結合のための競合を示す。

図12は図10と類似のグラフであり、TAR RNA

とTAR RNAステムにおける位置40でA残基を運ぶ変異体との間のtat結合のための競合を示す。

図13は図10と類似のグラフであり、TAR RNAとTAR RNAステムにおける位置22でU残基を選び、位置40でA残基を運ぶ変異体との間のtat結合のための競合を示す。

図14は図10に類似のグラフであり、TAR RNAとTAR RNAステムにおける位置22でG残基を運ぶ変異体との間のtat結合のための競合を示す。

図15は図10に類似のグラフであり、TR RNAとRR RNAステムにおける位置39でG残基を運ぶ変異体との間のtat結合のための競合を示す。

図16は図10に類似のグラフであり、TAR RNAとTAR RNAステムにおける位置26でC残基を選び、位置39でG残基を運ぶ変異体との間のtat結合のための競合を示す。

図17は図10に類似のグラフであり、TAR RNAとTAR RNAステムにおける位置26でA残基を選び、位置39でU残基を運ぶ変異体との間のtat結合のための競合を示す。

図18はa) 全長59mer TAR転写物のRNA配列、b) TARの頂部に対応する化学的に合成された29merのRNA配列、c) アニールされたときtat結合部位を表わすUの豊富なバルジおよびフランキング塩

基対を形成する14および17長の化学的に合成されたオリゴヌクレオチドのRNA配列を示す。

図19は競合フィルタ結合検定の結果を示す、競合RNA (nM) に対する保持される%計数のグラフであり、化学的に合成された29merまたは化学的に合成された17mer+14merから形成された二重鎖のRNAが各場合において酵素的に合成された59merのRNA転写物とほとんど同じようにtatへの結合に対して競合することを証明する。

図20はa) U_{23} が2'-デオキシウリジン (dU) または2'-2'-O-メチルウリジン (2'-O-MeU) のいずれかによって置換された場合の化学的に合成された29merのRNA配列、およびb) U_{23} または U_{24} または U_{25} が2'-デオキシチミジン (dT) または5-ブロモ-2'-デオキシウリジン (BrdU) によって置換された場合の、14merにアニーリングされて二重鎖のRNAを形成する化学的に合成された17merのRNA配列を示す。

図21は競合フィルタ結合検定の結果を示す図19に類似のグラフであり、dUまたは2'-O-MeUのいずれかによって U_{23} で置換された化学的に合成された29merが各場合において修飾されない29merと同様にtat結合に対して競合することを証明する。

図22は競合フィルタ結合検定の結果を示す図19に類

似のグラフであり、dTによって U_{23} または U_{24} で置換された17merにアニーリングされた14merからなる二重鎖RNAは各場合において修飾されない二重鎖と同様tat結合に対して競合するが、dTによって U_{25} で置換された二重鎖は修飾されない二重鎖に比べるとうまく競合しないということを証明する。

図23は競合フィルタ結合検定の結果を示す図19に類似のグラフであり、BrdUによって U_{23} で置換された17merにアニーリングされた14merからなる二重鎖RNAはtat結合に対してうまく競合しないが、 U_{24} で置換されたものは置換されない二重鎖と比べると同じように競合することを証明する。

図24は競合フィルタ結合検定の結果を示す図19に類似のグラフであり、BrdUによって U_{23} で置換された17merへアニーリングされた14merからなる二重鎖RNAが置換されない二重鎖と比べると同様にtat結合に対して競合することを証明する。

図25は15および18長の化学的に合成されたオリゴヌクレオチドを示し、これはアニーリングされたときUの豊富なバルジを含む二重鎖RNAを形成するが、そこで U_{23} 、 U_{24} または U_{25} は各場合において4-チオ-2'-デオキシチミジンによって置換される。

図26は競合フィルタ結合検定の結果を示す図19に類似のグラフであり、4-チオdTによって U_{23} 、 U_{24}

または U_{25} のいずれかで置換された18merへアニーリングされた15merからなる二重鎖RNAが各場合において置換されない二重鎖よりうまく結合に対して競合することを証明する。4-チオdTによって置換された U_{25} 類似体は修飾されない59merと同様に競合する。

図面の詳細な説明

図1

HIV-1 遺伝子発現の機構が概略的に示される。新たに感染した細胞において、LTRへの細胞転写因子の結合は(1)で示されるtat、revおよびnefをコードする初期のmRNAの転写の基底レベルを刺激する。tatレベルが細胞中で上昇するにともない、転写はトランス活性化機構によって刺激される。この結果初期のmRNAの生産は増加され、核内に部分的にスプライシングされた、またはスプライシングされないRNA転写物が蓄積される(2)。細胞内におけるrevレベルの上昇に伴い、rev応答性エレメントを運ぶRNAは核から移出される。これらはgag、polおよびenvによってコードされた構造タンパク質のためにmRNAとして作用する。全長のHIV転写物はgag-polのためのmRNAとしても、かつウィルス粒子RNAとしても作用する(3)。

図2 調節RNA tat (TAR、トランス活性化応答領域) および rev (RRE、rev応答領域) の位置および配列がHIV遺伝地図の下に示される。

図3 TAR領域の構造を変える変異体の最近の研究は、TAR RNA配列が生じるべきトランス活性化のために核内で転写され、正しく折り畳まれねばならないということを強く示唆する。TAR RNA配列は安定したヌクレアーゼ抵抗性ステムループ構造を取入れる(5)。この構造の2つの顕著な特徴はループ配列(残基30-35)および二重螺旋ステムの先端近くに位置決めされた3つの塩基対を形成しない残基(残基23-25)によって作り出された「バルジ」である。TARにおけるバルジおよびループ配列はいずれもHIV-1とHIV-2との間に保存され(8、9)いずれの領域もヌクレオチド+19および+42の間に位置決めされた官能基が活性の最小のTAR配列に存在する(5、10-14)。

TARにおけるtatのための認識部位を正確に位置付けるために、E. coli (6、94)において発現された精製されたtatプロテインのHIV-1 TAR変異を含む転写物を結合する能力が研究された。前の実験はアンチセンスTAR RNA配列が15の位置でしかTARと異ならなかったにもかかわらず、tatを結合できないこと(6)を示した(図3を参照)。TARへのtat結合へのこれらの配列の変化の各々の寄与を査定するために、一連のTAR分子が構成され、これはステムまたはループ構造における一連の変異と同様、ループ、上部ステムまたは下部ステムのいずれかのセンスまたはアンチセンス配列

を有する(図3)。HIV-1 tatはHIV-2 TARの第1のステムループを運ぶLTRをトランス活性化することができる(20、25)。2つのTAR配列が緊密に相関せず(8、9)、かつループおよびバルジ領域における残基のみが保持されるため、この配列がHIV-1 tatを結合することができるかを決定することも興味深かった。

図3において、TAR RNA配列および提案された二次構造が示され、番号付けは位置+1におけるキャップされたG残基に関連する。提案された二次構造はTAR RNAの前の分析に基づく(5)。HIV-1_{ssu} TARおよびHIV-2_{ssu} TARのいずれにも存在する保持された配列の特徴はボックスに入れられ、かつ影を付けられる。センス配列と異なるHIV-1 TARへのアンチセンス配列における配列はボックスに入れられる。矢印はRNA構造の下部ステム、上部ステム(Uの豊富な泡を含む)およびループへの分割点を示す。SSA:センスステム、アンチセンスループ配列。ASS:アンチセンス下部ステム、センス上部ステムおよびループ配列。SAS:センス下部ステムおよびループ配列によってフランキングされたアンチセンス上部ステム。アンチセンス:HIV-1_{ssu} TARへのアンチセンス配列。G3からU3へ(ループ):残基32-34がウリジン(U)へ転換される。デルタU3(バルジ):残基23-25が欠失される。

モルの³Pで均一に放射性標識付けされたTAR RNAと、0.5 μg子ウシ胸腺DNAと、0.2 μg酵母tRNAと、40単位RNAasin(プロメガ)と、50 mM Tris-HCl pH7.9および20 mM KClを含んだ実験からのものである。反応混合物は氷の上に据えられ、増加する量のHIV-1 tatタンパク質が加えられ、その反応混合物は予め洗浄されたニトロセルロースフィルタ(ミリポア(Millipore) 0.45 μm孔径サイズ)を介して濾過された。フィルタは乾燥され、液体シンチレーション計数によって数えられた。放射性標識付けされたRNAのフラクション限界はHIV-1 tat濃度に対してプロットされた。

TAR:野生型TAR RNA(HIV_{ssu}配列)。

U3欠失:3つのウリジン(U)塩基(残基23-25)が欠失されたTAR RNA配列。

U3からG3へ:3つのウリジン(U)塩基(残基23-25)がグアニン(G)へ転換されたTAR RNA配列。

図5はこのようなRNAフラグメントの合成における使用が可能なオリゴヌクレオチドの構造を示す。ヌクレアーゼ開裂に対するその感受性を低下するか、さもなければその安定性を向上するために、オリゴヌクレオチドへの修飾は前述のように塩基B1およびB2の構造、糖骨格Rまたはリン酸結合W、X、YおよびZへの変更を含んでもよい。

U3からG3へ(バルジ):残基23-25がグアニン(G)へ転換される。G₂₃からC₂₃へ:TARステム/ループ構造の頂部を分断することが予想された点変異。G₂₃からC₂₃へ+C₂₃からG₂₃へ:正常なTARステム/ループ構造を有することが予想された対の点変異。

図4 ラボラトリ・オブ・モレキュラ・バイオロジ(Laboratory of Molecular Biology)(ケンブリッジ(Cambridge))における研究は、HIV-1 tatプロテインが見かけの解離定数12 nMを有するゲル遅延、フィルタ結合およびイムノプレシテーション検定においてHIV-1 TAR RNAに特異的に結合することを示した(6、94)。

HIV-1 tatはHIV-2 TAR配列にも特異的に結合する(以下、ならびに図6および7を参照)。HIV-1およびHIV-2 TAR配列間で共有される相同の唯一の領域がループ領域およびUの豊富な泡を含むステムの短い領域における残基であるため、tat結合部位はこれらの領域の1つの中に位置決めされることになる。

これらの配列の各々における残基を変える一連の変異が調製される。生体外におけるtat結合は無傷のUの豊富な領域配列の存在に依存するが、ループからは大きく独立している。

図4にグラフで示される結果は、結合反応物(500 uI)が100,000 Ci/モルの比活性において40 n

図6および7はゲル遅延およびフィルタ結合検定実験の結果をそれぞれ示し、HIV-2 TAR RNAにおける第1のステムループ構造へのHIV-1 tatの結合を証明する。使用される方法および得られた結果は以下に概説される。

1) ゲル遅延検定(図6)

方法

RNA転写物はTAR領域残基+1ないし+57のT3またはT7 RNAポリメラーゼのいずれかでの転写によって調製され、ブルースクライブ(Bluescribe) M13⁺ 発現ベクター(Stratagene)のHindIIIとEcoRI部位の間でクローン化された。HIV-1 TAR、SSA、SAAおよびSASに対応するRNA転写物はEcoRIで線状にされ、かつT3 RNAポリメラーゼで転写されたクローンから合成された。アンチセンスHIV-1 TAR、AAS、ASSおよびASA(図示せず)配列に対応するRNA転写物はHindIIIで線状にされ、かつT7 RNAポリメラーゼを使って転写された同一のプラスミドから調製された。すべての他のRNA分子はプラスミドベクターのEcoRI開裂に続くT3 RNAポリメラーゼを使用して合成された。RNA生体物は各々その5'末端でベクター配列の13のヌクレオチドおよびその3'末端で4つのヌクレオチドを運ぶ。これらの配列はtatのTAR(6)への結合に影響を及ぼさない。転写

混合物は30 μ lの最終容量において、1 μ gの線状にされたプラスミド、40 mMのトリス (Tris) -HCl pH 8.0、10 mMのMgCl₂、2 mMのスペルミジン (Spermidine) -HCl、50 mMのNaCl、各々100 μ Mのリボヌクレオチド三リン酸、40 μ Cl (アルファ-³²P) UTP (410 Ci/mol) および10ユニットのRNAポリメラーゼを含み、37°Cで30分間インキュベートされた。エタノールからのフェノール抽出および沈殿後、RNAは9%ポリアクリルアミド変性ゲルから精製された。RNA生産物の比活性が決定され、適切な量が結合検定で使用された。結合反応混合物 (15 μ l) は1 ngの均一に標識したRNAプローブ、0.5 μ gの子ウシ胸腺DNA、0.2 μ gの酵母tRNA、40ユニットのRNA ϕ in (プロメガ (Promega))、50 mMのトリス-HCl および20 mMのKCl および0ないし600 ngのtatプロテインを含み、以前(6)に説明されたようにE. coliバクターガラクトシダーゼtat融合タンパク質から調製された。10ないし20分間30°Cか4°Cのいずれかでインキュベーションした後、反応混合物は3.3 mM酢酸ナトリウム、6.7 mMトリス (HClでpH 7.9に調整された) 中6%の非変性ポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド (Acrylamide) :ビス (Bis)、40:0.5) に与えられた。ゲル緩衝液は室温で約2時間35 mAでの電気泳動の間再循環され

た。ゲルは乾燥され、強調スクリーンを使用して-80°CでX線フィルムに写された。

結果

図6のオートラジオグラフはtatとHIV-1 TAR, HIV-2 TAR, SSA, ASS, およびGからUへ (ループ) の³²P標識したRNA転写物との間での分離した複合体形成を示す。複合体は、SSA、AAS、デルタU3 (バルジ)、UからGへ (バルジ) またはアンチセンス配列とは何も形成されなかった。各ゲルレーンの上の数字は各反応混合物に加えられた200 ng/ μ lでのHIV-1 tatプロテインの μ lを示す。RNA配列は図3に示されるとおりである。

ゲル遅延 (図6) およびセンス/アンチセンスキメラを使用するフィルタ結合検定 (データは図示せず) もまた、TARへのtat結合は常にステムの上部領域にあるがループにはないセンス配列の存在に依存することを示した。このように変異体ASS、SSAおよびASAの各々が野生型の親和力でtatを結合し、一方変異体SAS、AASおよびSAAの各々は大幅に低減された親和力でtatを結合し、ゲル遅延検定 (図6) で複合体を形成できない。これはtat結合部位はTARの上部ステム領域に置かれなければならないという仮定のさらなる証拠である (図3)。

1) フィルタ結合検定 (図7)

-1 tatプロテインを添加することによって開始された。結合反応混合物はそれから予め水洗されたニトロセルロースフィルタ (ミリポア0.45 μ M孔サイズ) を介して減圧下で濾過され、フィルタは乾燥され、液体シンチレーション計数によってカウントされた。

結果

図7に示されるグラフはTAR RNAと様々な変異体TAR配列との間のtat結合に対する競合を例示する。数値データは表1に与えられる。³²P標識したTAR RNA範囲のフラクションは、競合RNAの最終濃度に対してプロットされた。この実験で使用されたTARの配列および様々なTAR変異体は図3に示されるとおりである。これらの実験において、反応物は20 nMのTARおよび40 nMのtatプロテインおよび40 nMから6 μ Mの増大する量の標識していない競合RNAを含んだ。このグラフは2 μ Mより大きい競合RNA濃度で得られたデータを含んでいない。直接フィルタ結合検定で測定されるように、複合体におけるtatとTARとの等モル比およびK_d=12 nMを仮定すると、入れたTAR RNAの70%は競合RNAがない場合にフィルタ上で保持されることが予期される。理論上、40 nMのtatは純TAR RNA濃度が56 nMである場合に入れたTAR RNAの50% (D_{1/2}) を結合するであろう。この値は64 nMのTARのD_{1/2}に対する測定値とよく一致する (パネル

結合検定における改良点は、ほぼ等モル濃度のタンパク質およびRNAを使用してtatとTAR RNAとの間の複合体の形成を考慮した。これらの検定において、tatへの低減された結合を示すTAR変異体もまた、野生型のRNA配列に結合するtatの弱い競合阻害剤である。たとえば、競合結合検定において、Uの豊富な泡の3つのU残基の各々がG残基によって置換されるTAR変異体は240 nMの見かけのK_dを有する。

方法

競合RNAは40 mMのトリス-HCl pH 7.6、25 mMのNaCl、16 mMのMgCl₂、10 mMのジチオトレイトールおよび100 μ gの純粋なT3 RNAポリメラーゼを含む2.5 mlの反応混合物中100 μ gの適切なDNA鋳型の転写によって生産された。ポリメラーゼ酵素はプラスミド (pCM56) (26) を使用するE. coli BL 21における過発現によって生産された。結合反応物 (500 μ l) は水上で生じ、80 pMの³²P標識したTAR RNA (17,600 dpm、200 μ Cl/nモル) および標識していないTAR RNAを含み、20 nMの最終濃度、0.5 μ gの子ウシ胸腺DNA、0.2 μ gの酵母tRNA、40ユニットのRNA ϕ in (プロメガ)、50 mMのトリスHCl および20 mMのKCl を与えた。競合RNAを加えた後、結合は400 ng/ml (40 nM) の最終濃度までHIV

a)。低い親和力でtatを結合するTAR変異体は弱いコンペクターであり、 $D_{1/2}$ に対してより高い値を与える。

tatによって弱く結合されるTAR RNA配列もまた、したがって、溶液中の結合の弱い競合阻害剤である。直接結合検定 ($K_d = 30 \text{ nM}$ —表1)、または競合結合検定 (図7aおよび表1、 $D_{1/2} = 160 \text{ nM}$) において測定されるHIV-2 TARに対するtatの親和力は、HIV-1 TARに対するものよりほぼ2.5倍低かった。バルジU残基のG残基との置換はゲル遅延検定におけるTARへのtat結合を終らせ (図6)、tat親和力の劇的な低減、 $D_{1/2} = 400 \text{ nM}$ 、 100 nM より大きい K_d を生じた (図7cおよび表1)。Uの豊富なバルジの遺伝子欠失もまたゲル遅延検定においてTARへのtat結合を終らせ (図6)、 $D_{1/2}$ を290 nM、70 nMより大きい K_d まで増大させた。対照的に、ループ配列の3つのG残基のU残基との置換はほぼ野生型の親和力、 $D_{1/2} = 66 \text{ nM}$ 、 $K_d = 25 \text{ nM}$ でtatを結合することが可能なRNA分子を生じた (図6および図7cならびに表1)。G₉₃のC残基との置換はUの豊富なバルジとループとの間のステムを脱安定化させることが予期される (図3)。この変異体はゲル遅延検定においてtatに結合すること (図6)、または効率的に競合すること (図7bおよび表1、 $D_{1/2} = 680 \text{ nM}$ 、 $K_d = 100 \text{ nM}$) ができなかったが、結合はC37のG37への第2の変異

より大きい補償によって回復された (図7bおよび表1、 $D_{1/2} = 76 \text{ nM}$ 、 $K_d = 24 \text{ nM}$)。

TARセンス/アンチセンスキメラを使用する競合実験は行なわれなかった、なぜならTAR RNAは室温でアンチセンスRNAと容易にアニールし、tat/TAR複合体 (データは図示せず) のそれに類似のポリアクリルアミドゲル中で移動性を有する安定した二重鎖を生じるからである。このハイブリッド形成反応はTARへのタンパク質結合に干渉することが予期される。

図8

もしTARへのtat結合がトランス活性化に必要であれば、tatに対する低親和力を有するTAR配列を運ぶウィルスLTRは、生体内のtat依存プロモータ活性を常に低減したはずである。TAR上での部位定方向突然変異実験は、トランス活性化はUの豊富なバルジ (10、11) およびループ配列 (12、27、28) の双方における配列を必要とすることを示した。これらの観察はトランスフェクション実験においてtatに対して既知の親和力を有するTAR変異体を使用して拡大され、その結果は図8に示される。これらの実験はHeLa細胞 (図8a-d) かまたはtatの構造性生産体、HeLa/C63/tat細胞 (図8e-f) のいずれかを使用した。

図3に描かれるTAR配列は、LTRおよび感染性プロウィルスクローンNL4 (29) に由来する5' フランキ

ング配列のはほぼ300の塩基を運ぶテストプラスミド、pD5-3-3に導入された。細菌性クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子およびSV40イントロンおよびpSV2-CAT (30) からのターミネーター配列は、+77でHindIII部位にクローン化することによってTARの下流に挿入された。トランス活性化はHeLa細胞のテストプラスミドおよびtat発現プラスミドpC63-4-1 (6) (図10のパネルa-d) との同時トランスフェクションか、またはHeLa/C63/tat (クローン9) 細胞 (パネルe-h) へのテストプラスミド単独のトランスフェクションのいずれかによって測定された。

これらの実験において、細胞はT25フラスコの中で 3×10^5 の密度でプレート培養され、リン酸カルシウム法 (31) によってトランスフェクトされた。HeLa細胞中のトランスフェクションは、8.0 μg のテストプラスミド、1.0ないし10 μg のpC63-4-1プラスミド、および10 μg の子ウシ胸腺腫体DNAを使用した。HeLa/C63/tat (クローン9) 細胞のトランスフェクションは、0.5ないし10 μg のテストプラスミドおよび10 μg の子ウシ胸腺腫体DNAを使用した。HeLa/C63/tat (クローン9) 細胞は、HeLa細胞のヘルパーフリーの両栄養性C63-4-1MoMuLV-tatウィルスでの感染によって調製された。2 m

g/ml G418における選択の後、個々のクローンは伸長され、tatプロテインの発現はtatへのモノクローナル抗体を用いるイムノプレシピテーションによって確認された (6)。細胞抽出物は150 μl の溶解緩衝液 (0.2%のNP40、20 mMのトリスpH8.0、4 mMのMgCl₂) 中でのトランスフェクション後48時間で調製され、65℃で10分間熱不活化され、-20℃で保存された。CAT活性が検定 (30) の直線の範囲で測定されたことを確実にするために、そのアセチル化された形でのクロラムフェニコールの50%未満の転換において、各トランスフェクションに対して、5から70 μl の抽出物を含む3つの異なるアリコートがCAT活性について検定された。反応物は70 μl 、10 μl のAcCoA (溶解緩衝液中の2.5 mg/ml)、0.5 μl (14℃) -クロラムフェニコール (60 mCi/mmol) の最終容量まで溶解緩衝液で希釈された抽出物を含み、45分間37℃でインキュベートされた。反応生成物は酢酸エチルで抽出され、シリカプレート上の薄層クロマトグラフィによって分離され、バンドは抽出物の10 μl 当りのクロラムフェニコール転換効率を計算するためにシンチレーション流体中でカウントされた。

HIV-1 TAR領域を運ぶウィルスLTRは、tatプラスミドの最適レベルが存在するところでは40倍と150倍との間のCAT活性の基底レベルを超える上昇を

示した。バルジ領域(デルタU、UからGへ、SAS、AAS)かまたはループ領域(SSA、ASA)のいずれかにおける変異は、トランス活性化において4ないし20分の1の低減を生じた。バルジまたはループ領域における変化を有するすべてのLTRは無傷のTAR領域を有するLTRより際立って活性的ではなかったが、上部ステムおよびループ領域の双方に対して変化を有する変異体SAAのみが、高いtatプラスミド濃度で基底レベルを超えるLTR活性の実質的な上昇を示さなかった。G28のC28への点変異もまた欠陥表現型を生じ、それはC37のG37への補償突然変異によって野生型レベルに回復された(図8a)。

HeLa/C63/tat細胞において、HIV-1 LTRによって促進された最高のCAT発現は、HeLa細胞の最適tatプラスミド濃度でのCAT発現より2ないし3倍低かった。これはHeLa/C63/tat細胞におけるtat発現のレベルがトランスフェクトされたHeLa細胞で達成されたtat発現の最高レベルより幾分低かったことを示す(図8e-h)。HeLa/C63/tat細胞においては、変異体SSA、SAA、ASA、SASまたはAASに対して観察されたCAT発現の基底レベルを超える十分な上昇がなかった(図8gないしh)。Uの豊富なバルジ(デルタU、図8f)の遺伝子欠失またはG28のC28への点変異(図8e)もまたマル表現型

を生じた。対照的に、ASSプラスミドは野生型発現レベルを示した(図8g)。しかしながら、バルジにおいてU残基がG残基に置換された場合(UからGへ、図8f)、またはG残基がループにおいてU残基に置換された場合(GからUへ、図8f)、高いプラスミド濃度で著しいCAT活性が観察された。

TAR RNAへのtat結合の化学量論(図9)

ケンブリッジ(Cambridge)の分子生物学研究所(the Laboratory of Molecular Biology)での初期研究は、tatプロテインとTAR RNAとの間の配列特異的相互作用を示した(6)。しかしながら、tatの重要なフラクションは適切に折り畳まれなかったかもしれず、かつ解離定数から出された推定値(30 nMより小さい K_d)はむしろ概算であるという懸念があった、なぜなら測定はタンパク質の高いモル過剰(1,000ないし10,000倍)で行われたからである。結合検定におけるtatプロテインの調製およびRNAの高濃度の用途の双方における改良点(“方法”以下および引用文献94を見られたい)は、タンパク質およびRNAの等濃度を使用する複合体形成の証明、およびTAR RNAへのtat結合に対する配列要求の詳細な研究を考慮に入れた。

図9aは飽和結合実験の結果を示し、その実験において一定濃度の標識したRNA(10 nM)は上昇する濃度のtatプロテインでインキュベートされ、ニトロセルロー

スフィルタ上に保持されたRNAのフラクションが測定された。結合は“方法”で以下に説明されるようにフィルタ結合検定によって測定され、E. coliにおいて発現されたヒト成長ホルモン-tat融合タンパク質のCNBr開裂によって調製された単量体のtatプロテインを使用した。飽和結合に対する反応物は10 nMで標識したTAR RNAまたはアンチセンスTAR RNAを含み、0ないし300 nMの間で精製されたtatタンパク質を含んだ。アンチセンスTAR RNAは対照として使用された、なぜならアンチセンスTARはゲル遅延検定においてtatとともに安定した複合体を形成することができないからである(ディングウォール(Dingwall)他、1989年)。

tatは $K_d = 12$ nMの見かけの解離定数でHIV-1 TAR RNAに結合したが、アンチセンスRNAへの結合は大幅に低減された(140 nMより大きい K_d)。判然としない結果が感染分子クローンで発見されたUUUかまたはUCUかのいずれかのバルジ配列を有するHIV-1 TAR配列を使用して得られた(表1)。

tat/TAR相互作用の化学量論は広い範囲にわたってTAR RNA濃度を変える一方で、tatプロテイン濃度を K_d 近くで一定に保つことによって決定された。データのスキッチャードプロットは図9bに示される。このスキッチャード分析のために、tatプロテイン濃度

は40 nMで一定に保持され、RNA濃度は7 nMと320 nMとの間で変化した。標識したRNAの総量は結合反応物において一定に保たれたが、RNAの比活性は変化した。縦座標は化学量論、 v 、タンパク質のモル当り結合されたRNAのモル数である。横座標は v の遊離RNA濃度に対する比である。切片は約1の化学量論、 v に対する値を与え、線の傾きは最小自乗法によってデータに当てはめられ、11.8 nMの K_d を示し、飽和結合実験から得られた値と非常によく一致した。これらの結果はtatはTARと1対1の複合体を形成し、かつ新しい調製物における本質的にすべてのtatモノマーはRNA結合において活性であることを示す。

方法

a) tatプロテインの調製

tatプロテインはベクターガラクトシダーゼ-tat融合タンパク質(6)かまたはヒト成長ホルモン-tat融合タンパク質(85)かのいずれかから改良された方法を使用して調製された。要するに、融合タンパク質を含む封入体ベレットは7MのGdHCl、50 mMのトリス-HCl pH 8.0、2 mMのEDTA、2 mMのDTT中で可溶化され、融合タンパク質は6Mの尿素、50 mMのトリス-HCl pH 8.0、2 mMのEDTA、2 mMのDTTを含む緩衝液中のQ-セファロースおよびS-セファロース(ファーマシア(Pharmacia))上のイオン

交換クロマトグラフィーによってほぼ均質になるまで精製された。シスチン残基は20 mM 2-ヒドロキシエチルジスルフィドとのジスルフィド交換によって保護され(86)、かつタンパク質は臭化シアンによって開裂された(8)。塩基性tatプロテインはそれから6 Mの尿素中のQ-セファロースおよびS-セファロース上のイオン交換クロマトグラフィーによって酸性ヒト成長ホルモンベプチドから分離された。保護基はそれから10 mMのDTTを加えることによってタンパク質から除去され、タンパク質は50 mMのトリス-HCl pH 8.0、100 μ MのDTT、10 μ MのZnCl₂を含む緩衝液中で、6 Mの尿素、5 Mの尿素、3 Mの尿素、1 Mの尿素および0 Mの尿素に対する段階的な透析によって再生された。この態様で再生されたtatプロテインはセファロース12カラム(ファーマシア)からモノマーとして溶出し、単一バンドとしてポリアクリルアミドゲル上で移動する。双方の方法によって調製されたタンパク質は結合検定において共通した挙動を示した。

b) TAR RNAの調製

RNA転写物はTAR領域残基+1ないし+57のT3またはT7のいずれかのRNAポリメラーゼでの転写によって調製され、ブルスクライプM13⁺発現ベクター(Stratagene)のHindIIIとEcoRI部位との間でクローン化された。HIV-1 TAR、SSA、SA

Cl₂、10 mMのDTT、各3 mMのリボヌクレオチド三リン酸および100 μ gの純粋なT3 RNAポリメラーゼを含む2.5 mlの反応混合物中の100 μ gの適切な線状DNA鋳型の転写によって生産された。ポリメラーゼ酵素はプラスミドpCM56(モリス(Morris)他、1986年)を使用してE. coli BL21における過発現によって生産された。RNAは予備的な変性ゲル電気泳動によって精製され、0.5ないし1 mgの純粋なRNAはこの方法によってルーチン的に生産された。

ヌクレアーゼ消化実験(データは図示せず)はTAR RNAの3'および5'側の短い伸張の存在は、ミューシング(Messing)他(5)によって説明された型のRNAヘアピンループを形成するためのこれらの配列の能力に影響を及ぼさないことを示した。T7またはT3のいずれかの転写反応物から調製されたTAR RNA、またはオリゴヌクレオチド鋳型(6)から調製されたTAR RNAは区別できないほどにtatを結合する。さらに、HIV転写物の第一の110ヌクレオチドを介してTAR配列を伸張するより長いRNA分子は、行なわれた実験の大半で使用された59ヌクレオチド長の転写物と同等にtatを結合する(データは図示せず)。

c) フィルタ結合検定

tatプロテインのTAR RNAへの結合に影響を及ぼす様々なパラメータが研究され、結合条件が最適化され

AおよびS.A.Sに対応するRNA転写物は、EcoRIで線状にされT3 RNAポリメラーゼで転写されたクローンから合成された。アンチセンスHIV-1 TAR、AAS、ASSおよびASA(図示せず)配列に対応するRNA転写物は、HindIIIで線状にされ、かつT7 RNAポリメラーゼを使用して転写された同一のプラスミドベクターのEcoRI開裂の後、T3 RNAポリメラーゼを使用して合成された。RNA生産物は各々その5'末端でベクター配列の13のヌクレオチドを選び、その3'末端で4つのヌクレオチドを選ぶ。転写混合物は30 μ lの最終容量中に1 μ gの線状にされたプラスミド、40 mMのトリス(Tris)-HCl pH 8.0、10 mMのMgCl₂、2 mMのスペルミジン(Spermidine)-HCl、50 mMのNaCl、各100 μ Mのリボヌクレオチド三リン酸、40 μ Cl(アルファ-³²P)UTP(410 Ci/mモル)および10ユニットのRNAポリメラーゼを含み、37℃で80分間インキュベートされた。エタノールからのフェノール抽出および沈殿後、RNAは9%のポリアクリルアミド変性ゲルから精製された。RNA生産物の特異的な活性が決定され、適切な量が結合検定で使用された。

結合検定のための大量のRNAが40 mMのトリス-HCl pH 7.6、25 mMのNaCl、16 mMのMg

Cl₂、10 mMのDTT、各3 mMのリボヌクレオチド三リン酸および100 μ gの純粋なT3 RNAポリメラーゼを含む2.5 mlの反応混合物中の100 μ gの適切な線状DNA鋳型の転写によって生産された。ポリメラーゼ酵素はプラスミドpCM56(モリス(Morris)他、1986年)を使用してE. coli BL21における過発現によって生産された。RNAは予備的な変性ゲル電気泳動によって精製され、0.5ないし1 mgの純粋なRNAはこの方法によってルーチン的に生産された。

結合実験のために、結合反応物(500 μ l)は氷上で生じ、80 pM³²P標識したTAR RNA(17.600 dpm、200 μ Cl/nモル)および標識していない最終濃度が20 nMのTAR RNA、0.5 μ gの子ウシ胸腺DNA、0.2 μ gの酵母tRNA、40ユニットのRNasin(プロメガ)、50 mMのトリス-HCl pH 7.9および20 mMのKClを含有した。0ないし6 μ Mの競合RNAを添加した後、結合はHIV-1 tatプロテインを400 ng/ml(40 nM)の最終濃度まで添加することによって開始された。結合反応

混合物はそれから予め洗浄されたニトロセルロースフィルタ(ミリポア0.45μ孔サイズ)を介して減圧下で濾過され、フィルタは乾燥され、液体シンチレーション計数によってカウントされた。

tat プロテインによる変異体TAR RNAの低減された結合(10、11、12、13、14、15、16、17)

図10ないし図17に示されるグラフは、TAR RNAと様々な変異体TAR RNA配列との間のtat結合に対する競合を例示する。数値データは表2および表3に与えられる。図10および図11において、残基23がUである状態で、位置23、24、25で3つの対になっていない残基を含む領域は、tat結合にとって極めて重要であることが示される。図12、13、14、15、16および図17において、Uの豊富なバルジにすぐ隣接するステムの塩基対は効率的なtat結合に必要とされることが示され、バルジの一方側での残基22および40での結合対、およびバルジの他方側での塩基対G28-C39に対する要求が存在する。

表2および表3において、様々な変異体TAR RNA配列に対する $D_{1/2}$ 値は、変化したTAR RNA配列がCATレポータプラスミドD5-3-3に導入されたトランス活性化実験の結果とともに与えられる。弱く結合するTAR RNA配列は弱いコンペクターであり、 $D_{1/2}$ に

NAフラグメントがtatプロテインによって結合され得るかどうかを決定するために、29残基の合成オリゴリボヌクレオチド(図18b)は折り畳んでループおよびUの豊富なバルジを含むTARの頂上部分を発生することが可能な配列r(GCCAGAUUUGAGCCUGGGAGCUCUCUGGC)(29-mer)から化学的に合成された。このオリゴヌクレオチドは市販で入手可能な材料および試薬を使用して、前に述べられたように(102)標準的な固相合成方法によって調製された。2つの他のオリゴリボヌクレオチドもまた標準的な方法(102)を使用して化学的に合成された。これらは17-mer r(AGCCAGAUUUGAGCAGC)および14-mer r(GCUGCUCUCUGGCU)である。アニールされた場合、これらのオリゴリボヌクレオチドはtatプロテインに対する既知の認識配列に対応するUの豊富なバルジおよびフランキンギン塩基対を含むが、頂ループ(103)に欠ける二重鎖RNA(図18c)を形成することが可能である。

図19および表4は59-mer転写物のtatへの結合を化学的に合成された29-merのそれおよび化学的に合成された二重鎖14-mer+17-merのそれと比較するための競合フィルタ結合検定の結果を示す。これらの実験において、均一的に 32 P標識した転写物(10nM)は0-300nMの標識していない競合RNAに対

対して増大された値を示す。すべての場合に、弱くtatを結合する変異体は効率的にトランス活性化しない。

方法

競合RNAは図7に対する方法で説明されるように転写によって生産された。結合反応物(500ul)は500ulの最終容量中に20nMのTAR RNA、20,000dpm 32 P標識したTAR RNA、0.5ugの子ウシ胸腺DNA、0.2ugの酵母tRNA、40ユニットのRNasin(プロメガ)、50mMのトリス-HCl pH7.5、20mMのKClを含んだ。0から1000nMの様々な濃度で冷たい競合RNAを添加した後、結合は2ulのtatプロテイン(220ug/ml)を添加することによって開始された。結合反応混合物はそれから予め洗浄されたニトロセルロースフィルタ(ミリポア0.45μ孔サイズ)を通して濾過され、フィルタ上に保持された放射能は乾燥されたフィルタの液体シンチレーション計数によって検定された。

tat プロテインによる化学的に合成されたRNAの結合(図18および図19)

図18aは本発明者らが上に示した59残基の全長TAR RNAの構造がtatプロテインによって結合されることを示す。ボックス化された残基は特異的な認識において明らかに特に重要であるものである。59-merは上述のように転写によって調製される(図6)。より短いR

して競合された。その結果は双方の化学的に合成された種(29-merおよび14-mer+17-mer)はtatへの結合については59-merと満足に競合したが、各場合に0.4の $K_{0.5}$ を与える $D_{1/2}$ が2-3倍だけ増大したことを示す。これは化学的に合成されたRNAはtatプロテインに結合可能であり、タンパク質の抑制因子として作用し得ることを示す。

方法

a) 59-mer転写物の調製

これはミリガン(Milligan)他(104)の方法によって本質的に実行された。転写反応物(放射性標識したものについては0.12ml、標識していないものについては0.9ml)は、0.5mMのアニールした合成オリゴデオキシリボヌクレオチド鎖型およびT7プライマー、40mMのトリスHCl(37℃でpH8.2)、10mMのMgCl₂、5mMのDTT、1mMのスペルミジン、0.01%のトリトン(Triton)X100、50ug/mlのアセチル化されたBSA(アングリアン・バイオテック(Anglian Biotech))、0.6%のポリエチレングリコール6000(コッチ・ライト(Koch Light))、各2mMのATP、GTP、CTP、およびUTP、3.3ユニット/mlのRNasin(プロメガ)ならびにT7 RNAポリメラーゼ(10-30ユニット/ul)を含んだ。放射性標識付けのために、100uCiのアルファ 32

2' P-UTPが添加された。反応は37℃で2時間続くようにされ、25 mMまでのEDTAの添加によってストップされ、フェノール抽出され、水相はブタノール抽出(105)によってベレットにとられ、所望の59-merは10%ゲル上のポリアクリルアミドゲル電気泳動によって精製され、その後前のように(105)0.5Mの酢酸アンモニウム、1mMのEDTA、0.5%のドデシル硫酸ナトリウムおよびブタノール抽出でゲルから溶出された。転写物は1mMのEDTA (pH 7.4) 中で保存された。

b) オリゴリボヌクレオチドの化学合成

これはアプライド・バイオシステムズ380B DNA シンセサイザーおよび試薬を使用して前述(102)のように本質的に行なわれ、リボヌクレオシドホスホルアミグイト(U, bzA, bzCおよびibG)はミリゲン(Milligene)から得られた。脱保護の後、オリゴリボヌクレオチドは説明されたように(102)イオン交換h, p, l, c. によって、または説明されたように(102)ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって精製され、滅菌水中で保存された。

c) 結合結合検定

TK緩衝液(50mMのトリスHCl (0.5Mおよび22℃でpH 7.9)、20mMのKCl)中の結合検定反応物(0.5ml)は、10nM³²P標識した59-mer (約20,000cpm)、40nMのtatプロ

テイン、5ug/mlの子ウシ胸腺DNA、2ug/mlの酵母tRNA、40ユニットのRNasin (プロメガ) および様々な濃度(0-300nM)の標識していない融合RNA (59-mer、29-merまたは予めアニールした(90℃からゆっくり冷却された)14-merおよび17-mer)を含んだ。結合は氷上で2-15分間起こるようにされ、各反応物は二度予め洗浄された(0.6mlの水のように冷たいTK緩衝液)ミリポアGSフィルタ(2.5cmディスク、0.22um孔)を通して濾過され、フィルタはTK緩衝液(0.6ml)で洗浄された。乾燥されたフィルタは液体シンチレーションによってカウントされた。結果は添加された融合RNAの濃度に対するフィルタ上に保持されたカウントを示すグラフ(図19)上にプロットされた。

単一のヌクレオチド残基が修飾ヌクレオチドと置換される合成TAR類似体(図20、21、22、23および24)

tatによる認識に直接含まれるTAR上の官能基をさらに規定するために、かつまた修飾されたTAR構造がtatプロテインを結合することが可能であるかどうかを決定するために、TAR類似体は化学的に合成され、そのtat結合特性を修飾されていないTAR RNAと比較された。

図20aはTAR配列におけるU₂₃に対応する残基が

2'-デオキシウリジン(dU)か2'-O-メチルウリジン(2'-OMeU)のいずれかによって置換された化学的に合成された29-merの構造を示す。図20bは化学的に合成された14-merオリゴリボヌクレオチドおよび化学的に合成された17-merオリゴリボヌクレオチドから形成されたRNA二重鎖の構造を示し、ここではU₂₃、U₂₄またはU₂₅のいずれかに対応する残基は、2'-デオキシチミジンかまたは5-プロモ-2'-デオキシウリジンかのいずれかによって単独に置換される。

図21および表4は合成29-merのtatへの結合をU₂₃で修飾された化学的に合成された29-merのそれと比較するための融合フィルタ結合検定の結果を示す。これらの実験において、³²P-末端標識した29-mer (10nM)は0-120nMの標識していない融合RNAに対して融合された。その結果はdUか2'-OMeUのいずれかを含む双方の化学的に合成された29merは、tatへの結合に対して修飾されていない29-merと同様に融合したことを示す。これは糖残基で修飾を有する化学的に合成されたオリゴリボヌクレオチドはtatプロテインに結合し、tatプロテインの阻害剤として作用し得ることを示す。またU₂₃での2'-ヒドロキシル基はtatによる認識に含まれないようであることも明らかである。

図22および表4は17-mer+14-merの合成二重鎖のtatへの結合を、U₂₃またはU₂₄またはU₂₅が2'-デオキシチミジンによって置換された17-mer+14-merの合成二重鎖のそれと比較するための融合フィルタ結合検定の結果を示す。これらの実験において、標識していない14-merにアニールされた³²P-末端標識した17-mer (10nM)は、修飾された17-merおよび修飾されていない14-merから形成された0-120nMの標識していない融合RNAに対して融合された。

図23および表4ならびに表4は、17-mer+14-merの合成二重鎖のtatへの結合を、U₂₃またはU₂₄、またはU₂₅が5-プロモ-2'-デオキシウリジンによって置換された修飾17-mer+14-merの合成二重鎖のそれと比較するための融合フィルタ結合検定の結果を示す。これらの実験において、³²P-末端標識した29-mer (10nM)は、修飾された17-merおよび修飾されていない14-merから形成された0-120nMの標識していない融合RNAに対して融合された。

結果は位置23または24での2'-デオキシチミジンによる置換は融合に何の影響も及ぼさなかったが、位置25での置換はD_{1/2}の2-3分の1の低下を生じたことを示す。また位置24または25での5-プロモ-2'-デオ

キシウリジンによる置換は競合に何の影響も及ぼさなかったが、位置23での置換は $D_{1/2}$ における2分の1の低下を生じた。これは同時に修飾された糖および塩基残基を含む化学的に合成されたオリゴボヌクレオチドはtatプロテインを結合可能であり、tatプロテインの阻害剤として作用し得ることを示す。

方法

a) 29-merまたは17-merの ^{32}P 末端標識付け

50 μ lの標識付け反応物は、約200-300 pモルの29-merまたは17-mer、500 pモルのATPおよび40 μ Cのガンマー ^{32}P -ATP、50 nMのトリスHCl (pH 7.4)、10 mMの $MgCl_2$ 、10 mMのDTT、0.77%のスペルミジンおよび5 ユニットのT4ポリヌクレオチドキナーゼ (NEB) を含み、37°Cで20-30分間実行された。90°Cで2分間加熱した後、第2の反応がさらに5 ユニットのT4ポリヌクレオチドキナーゼを使用して37°Cで20-30分間実行された。標識した29-merまたは17-merは15%ゲル (29-mer) または20%ゲル (17-mer) 上のポリアクリルアミドゲル電気泳動によって精製され、59-mer転写物に対して上で説明したように溶出され、ブタノール抽出され、1 mM EDTA中で保存された。

b) 修飾された29-merの合成

適切な位置で2'-デオキシウリジン (グレン・リサーチ (Glen Research))、または2'-O-メチルウリジン (グレン・リサーチ) のホスホリアルミダイト (phosphorimidite) が結合反応において添加されたことを除いて、各修飾された29-merの化学合成は修飾されていない29-merについて上述したように実行された。精製は前に述べられたように (102) ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって行なわれた。

c) 修飾された17-merの合成

適切な位置で5-ブロモ-2'-デオキシウリジン (グレン・リサーチ) のホスホリアルミダイトが結合反応において添加されたことを除いて、5-ブロモ-2'-デオキシウリジン修飾を行なう17-merの化学合成は、修飾されていない17-merについて上に述べられたように実行された。2'-デオキシチミジン修飾を行なう17-merの化学合成は前に述べられた方法 (102) によって実行されたが、フェノキシアセチル (ABNから得られる) によって保護されたグアノシンおよびアデノシンのリボホスホリアルミダイトを使用し、かつ適切な位置でチミジンホスホリアルミダイト (アブライド・バイオシステムズ) が結合反応において添加された。これらのオリゴヌクレオチドのアンモニア脱保護は、修飾された条件下 (室温で20-24時間飽和されたメタノール性アンモニア) 実行された。すべての修飾された17-merは前に説明されたように

(102) イオン交換h. p. l. c. によって精製された。

c) 競合結合検定

TK緩衝液中の競合結合反応物 (0.5 ml) は、 ^{32}P -標識したおよび標識していない29-mer (約20,000 cpm) から形成された10 nMの二重鎖、または ^{32}P -標識したおよび標識していない14-merにアニールされた標識していない17-merから形成された10 nMの二重鎖、40 nMのtatプロテイン、5 μ g/mlの子ウシ胸腺DNA、2 μ g/mlの酵母tRNA、および様々な濃度 (0-120 nM) の標識していない競合RNA (29-merまたは修飾された29-mer (図21)、または17-mer+14-mer二重鎖または修飾された17-mer+14-mer二重鎖 (22, 23および24) を含み、上述のように実行された。

化学的に合成された修飾されたTARのtatプロテインに対する増強された結合

図25は化学的に合成された15-merオリゴボヌクレオチド、および U_{23} 、 U_{24} または U_{25} のいずれかに対応する残基が4-チオ-2'-デオキシチミジンによって単に置換される化学的に合成された18-merオリゴボヌクレオチドから形成されたRNA二重鎖の構造を示す。

図26および表4は18-mer+15-merの合成

二重鎖の結合tatを、 U_{23} または U_{24} または U_{25} が4-チオ-2'-デオキシチミジンによって置換された修飾18-mer+15-merの合成二重鎖のそれと比較するための競合フィルタ結合検定の結果を示す。これらの実験において、標識していない15-merにアニールされた ^{32}P 末端標識した18-mer (10 nM) は、0-120 nMの標識していない競合RNAに対して競合された (修飾されていない18-merおよび15-merから形成された二重鎖、修飾された18-merおよび修飾されていない14-merまたは59-merから形成された二重鎖)。同じ実験において、15-merおよび18-mer二重鎖は17-merおよび14-mer (図示せず) と同様に競合した。結果は各場合に4-チオ-2'-デオキシチミジン置換を含む二重鎖は、修飾されていない15-mer+18-mer二重鎖よりよく競合したことを示す。これは化学的に修飾されたオリゴボヌクレオチドは修飾されていないオリゴボヌクレオチドよりよくtatに結合可能であり、かつゆえにtatプロテインのよりよい阻害剤として作用し得ることを示す。

方法

a) 4-チオ-2'-デオキシチミジンを含むオリゴボヌクレオチドの合成

4-チオ-2'-デオキシチミジンを含む18-merオリゴボヌクレオチドは前に説明されたように (102)

合成されたが、リボホスホリアルミダイトが以下のとおりであったことを除く、つまりアデノシンおよびシチジンは β -チルフェノキシアセチル (Dr. エヌ・シンハ (N. S. Isha)、ミリゲンからの提供) によって、グアノシンはフェノキシアセチル (ABN) によって保護され、かつ4-チオTアミダイト (amidite) は5'-O-ジメトキシトリチルS-(p-ニトロフェニル)-4-チオチミジン2-シアノエチル-N, N-ジイソプロピルホスホリアルミダイト (106, 107) (Dr. ビー・コノリー (B. Connolly)、サウザンプトン (Southampton) 大学からの提供) であった。このアミダイト (無水アセトニトリル中100mg, 0.75ml) は、合成サイクルにおける適切な点で使用された。アンモニア脱保護が16-24時間室温で水酸化アンモニウム/エタノール (8:1) を使用したことを除いて、合成の終りでのp-ニトロフェニル基および塩基保護基の除去は説明されたように (107) 実行された。オリゴヌクレオチドは前に説明されたようにイオン交換h. p. l. c. によって精製され、滅菌水中で保存された。ヘビ毒ホスホジエステラーゼおよびアルカリホスファターゼでの消化によるオリゴヌクレオチドの分析は、5-メチル-2'-デオキシシチジンが4-チオT誘導体のアンモニア脱保護の間にも形成されなかったことを示した。

b) 修飾されていない18-merおよび15-mer

TARのtat認識は二重螺旋セグメントおよびG₂₄-C₂₅塩基対の状況において突出したU残基の存在を必要とする。ワトソン-クリック (Watson-Crick) 塩基対合が維持される限り、TARステム全体の他の塩基対の同一性は、トランス活性化 (10, 12, 27) またはtat結合 (6, 94) に必要とされるRNA構造への貢献は相対的に小さい。RNAステムループのバルジ残基を含む配列へのタンパク質の結合は前例がない訳ではない。R17コートタンパク質結合はR17パッケージング配列におけるバルジされたA残基 (32) の存在に決定的に依存する。tatのTAR (12nM) に対する解離定数はRNA結合タンパク質に対して典型的である。たとえば、3nMのK_dはRev-RRR複合体 (33, 34) および応答エレメントRNAステムループ (35) に結合する因子の双方に対して測定された。

さらに、バルジ領域はtatを結合するために、またはウィルスLTRをトランス活性化するためにウリジン残基のみを含む必要がない。感染HIV-1クローンで発見されるUCUかUUUかのいずれかのバルジ配列を有するHIV-1 TAR配列は、等価の親和力でtatを結合することが可能であり、これらの配列の双方は効率的にトランス活性化される。生体内データはバルジに関連して、残基U₂₃のみがTAR (11) のtat認識にとって重要であることを示す。U₂₃のAへの変異はトランス活性化

の合成

これらは上に説明されたように (102) 化学的に合成された。

c) 競合結合検定

TK緩衝液中の競合結合反応 (0.5ml) は³²P標識した (約20,000cpm) および標識していない15-merにアニールされた標識していない18-merから形成された10nM二重鎖、40nMのtatプロテイン、5ug/mlの子ウシ胎盤DNA、2ug/mlの酵母tRNA、および様々な濃度 (0-120nM) の標識していない競合RNA (59-merまたは18-mer+15-mer二重鎖、または修飾された18-mer+15-mer二重鎖、または修飾された18-mer二重鎖) を含み、説明されたように実行された。

議論

tatによって示されたTARの配列特異的認識はHIVトランス活性化におけるtatに対する要求を説明する。HIV-2 LTRの第1のステムループに由来するTAR RNAはHIV-1 tatを結合することが可能であり、HIV-1 tat (8, 9, 20, 25) によってトランス活性化される。Uの豊富な泡配列を変更するか、またはTARステムループ構造を崩壊させるTAR RNA変異はtat結合を終らせ、かつまたトランス活性化することができない。

を野生型レベルの18%まで低減することが報告されているが、U₂₄のAへの変異およびU₂₅のGへの変異はそれぞれ (11) 42%および49%だけトランス活性化を低減するだけである。さらに、ここに示されるように、U₂₄のCへの変異またはU₂₅のCへの変異はトランス活性化およびtat結合にわずかな影響しか及ぼさないが、U₂₃のCへの変異はTAR RNAへのtat結合およびトランス活性化を激的に低減する。これはtatはU₂₃を認識することを示すが、TARの構造もまた重要であるかもしれない。RNAステムループ構造において、バルジされた残基はバルジの塩基の数および型ならびにステム (87) におけるその位置に依存して変化する曲りまたはよじれを導入する。HIV-2 TARの第1のステムループはU₂₃に等価の塩基を含むバルジを有するが、この配列においてバルジは2つのウリジン残基しか含まないので、HIV-1 tatに対するその親和力は2.5分の1に低減される。

tat結合に必要とされないTAR RNAループにおける配列はそれにもかかわらずトランス活性化にとって重要である。バルジかまたはループかいずれかの領域における残基の置換を有するTAR配列は、低減されているが測定可能なトランス活性化を示す。宿主RNA結合タンパク質はループ配列 (36, 37) に結合することによってトランス活性化に参加するよう見える。高いプラスミドレ

ベルで観察されるTAR置換変異のいくつかの部分活性化は、tatまたは宿主タンパク質のいずれかに対するTAR上の弱い結合部位が制限された因子結合を考慮し得ることを示す。Uの豊富なバルジおよびループの双方が変更される二重変異は、単一領域における等価の変異より実質的に低いレベルのトランス活性化を示す。

カオ (Kao) 他 (38) およびセルビー (Selby) 他 (12) はtatは抗ターミネータとして間接的に作用し、TAR部位でまたはその近くでの伸張への障害を克服するのを助けることを提案した。そのモデルは短い早期に終結されたRNA転写物がtatのない場合 (12、38、39) において蓄積するという観察に基づく。このモデルに対する付加的な支持は核追加実験に由来し、その実験はHIV-1転写開始複合体はtat (40) が存在する場合に安定化されることを示し、かつTARは新生鎖 (16) 上で機能し得る証拠を示す。しかしながら、抗終結はTARそれ自体では発生しそうにない、なぜならトランス活性化を終らせるTARでの変異またはTARの遺伝子欠失は、構造的に高いレベルのLTR発現 (5、12、19、27、28) を結果としてもたらさないし、tat (40) が存在する場合に全長mRNAへ短いRNA転写物を「追跡する」ことは困難であるからである。カオおよびセルビーモデルの修飾されたバージョンは、そこではバクテリオファージ頭部 (12) に類似の態様で、TAR部位はRNAポ

リメラーゼ共同因子のための複合部位として機能し、かつゆえにより適切であるように思われる。転写を通じて、頭部領域はNタンパク質とともに宿主タンパク質nusAおよびnusBのためのRNA結合部位を生じ、RNAポリメラーゼおよびこれらの共同因子 (41、42) から構成される、遠位のターミネータ (43) での活性を克服することが可能な、転写複合体のアセンブリを可能にする。tat/TAR系において、tatおよび宿主共同因子は新生転写物上に存在するタンパク質結合部位によって媒介される反応においてRNAポリメラーゼと会合することが示される。修飾されたポリメラーゼは様々な遠位部位で伸張に対する障害を克服することによってウィルスmRNA生産を刺激することが可能である。

tatはTAR上の特異的結合部位に対する高い親和力を有するので、生体外でTARへのtat結合に干渉することが可能な化合物は効果的な抗HIV剤であることが証明される可能性が高いことが上から明らかであろう。

この特許の最初の出願に就いて、合成遺伝子からのTAR RNAの生体内の過発現が結果としてHIV増殖または遺伝子活性化 (108、109) の抑制をもたらし得ることを示す2つの報告があった。TAR RNA配列の過発現はおとりまたは競合抑制因子として作用し、tatプロテインのHIVコード化されたTAR RNA配列への結合を妨げる。結果として、ウィルス性遺伝子発現の活性

化および後代ウィルスの発生はない。

表1

HIV-1 tatのHIV-1 TARへの結合および変異体TAR配列

	K_d	$D_{1/2}$	K_{rel}
HIV-1 TAR (UUD)	12 nM	54 nM	1.00
HIV-1 TAR (UCU)	12 nM		
HIV-2 TAR	30 nM	180 nM	0.40
G ₂₀ からC ₂₀ へ	>100 nM	600 nM	0.09
G ₂₀ とG ₂₁ C ₂₀ へ: C ₂₇ とG ₂₇ G ₂₇ へ	24 nM	76 nM	0.84
デルタU (バルジ)	>70 nM	420 nM	0.15
GからUへ (ループ)	25 nM	56 nM	0.97
UからGへ (バルジ)	>100 nM	420 nM	0.15
アンチセンス	>140 nM	-	-

HIV-1 TARに対する解離定数は図9に示されるスキッチャードプロットから計算された。TAR変異体に対する解離定数 (K_d) はフィルタ結合法で観察された半最大結合によって見覆られたものであり、これらはHIV-1 TARに対するものほど幾分信頼性がない、なぜならより少ないデータが決定において使用されたからであり、飽和条件が常に得られたわけではないからである。変異体配列に対するtat親和力のよりよい測定値は $D_{1/2}$ であり、HIV-1 tatのHIV-1 TAR RNAへの結合を50%に低減する競合RNAの濃度である。 K_{rel} はHIV-1 TARおよび競合RNAに対する

$D_{1/2}$ 値の比率である。

表2

TAR RNAへのtat結合に対する、および生体内の
トランス活性化に対するヌクレオチド置換の影響

1. Uの豊富なバルジにおける変異

変異	$D_{1/2}$ (nM)	ユニットCAT 活性/ 500ng プラスミド
野生型: UUU, UCU	90	14,400
UUC	80	10,800
UCC	100	8,400
UU	100	4,200
U	673	1,420
CUU	630	1,250
CCU	1,330	1,850
CCC	1,778	840
CUC	2,137	430
CC	2,372	1,100

表3

TAR RNAへのtat結合に対する、および生体内ト
ランス活性化に対するヌクレオチド置換の影響

11. Uの豊富なバルジを取囲むステムにおける変異

変異	$D_{1/2}$ (nM)	ユニットCAT 活性/ 500ng プラスミド
野生型:	90	5,600
A22からG22へ	63	5,000
U40からA40へ	5,623	760
A22からU22へ; U40からA40へ	220	4,150
C39からG39へ	1,496	80
G26からC26へ; C39からG39へ	2,371	13
G26からA26へ; C39からG39へ	631	290

表4

二重鎖	$D_{1/2}$ (nM)	K_{rel} (59-mer)	K_{rel} (29-24U 14+17)
59-mer	40	1.0	
29-mer	100	0.4	
14+17	110	0.4	
29-mer	60		1.0
4U-23	65		1.1
2'-OMeU-23	50		1.2
14+17	40		1.0
4T-23	85		1.1
4T-24	30		1.2
4T-25	90		0.4
BrdU-23	70		0.6
BrdU-24	45		1.0
BrdU-25	35		1.1
15+18	65	0.3	0.8
14+17	50	0.4	1.0
59-mer	18	1.0	2.8
4-チオT-23	32	0.6	1.6
4-チオT-24	25	0.7	2.0
4-チオT-25	12	1.5	4.2

表4: $D_{1/2}$ (tatが存在する場合の ^{32}P RNAの

フィルタへの結合を半分に低減するために必要とされる競合RNAの濃度)、および転写59-merまたは化学的に合成された29-merもしくは14+17二重鎖と比較される様々な化学的に合成されたRNAに対する K_r 。($D_{1/2}$ の相対値)。 $D_{1/2}$ のすべての値は競合曲線から見積られ、20%のずれを受ける。下線は ^{32}P RNAの同一性を示す。

引用文献

1. デイトン, エイ・アイ, ソドロスキ, ジェイ・ジー, ローゼン, シー・エイ, ゴウ, ダブリュー・シー, & ヘイズルティン, ダブリュー・エイ, *Cell* 44, 941-947 (1986). (ヒトT細胞リンパ刺激ウィルス型 I 11 のトランスアクチベータ遺伝子は反復のために必要とされる)。
2. ローゼン, シー・エイ, ソドロスキ, ジェイ・ジー, ゴウ, ダブリュー・シー, デイトン, エイ・アイ, ロブケ, ジェイ, & ヘイズルティン, ダブリュー・エイ, *Nature* 319, 555-559 (1986)。
3. フィッシャー, エイ・ジー, ファインバーグ, エム・ビー, ジョセフス, エス・エフ, ハーパー, エム・イー, マーセル, エル・エム, レイズ, ジー, ゴンダ, エム・エイ, アルドビニ, エイ, デバック, シー, ガロ, アール・シー, & ウォンゲースタール, エフ, *Nature* 320, 367-371 (1986). (HTLV-III のトランスアクチベータ遺伝子はウィルス反復に重要である)。
4. ハウバー, ジェイ, パーキンス, エイ, ハイマー, イー・ビー, & カリン, ビー・アール, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 6364-6368 (1987)。
5. ミューシング, エム・エイ, スミス, ディ・エイチ, & ケイバン, ディ・ジェイ, *Cell* 48, 691-701 (1987). (ヒト免疫不全ウィルストランスアクチベータタンパク質による mRNA 蓄積の調節)。
6. ディングウォール, シー, アーンベルグ, アイ, ゲイト, エム・ジェイ, グリーン, エス・エム, ヒーフィー, エス, カーン, ジェイ, ロウ, エイ・ディ, シング, エム, スキナー, エム・エイ, & バレリオ, アール, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 6925-6929 (1989). (ヒト免疫不全ウィルス t a t プロテインは生体外でトランス活性化応答領域 (TAR) RNA を結合する)。
7. ミューラー, ダブリュー・イー・ジー, オカモト, テイ, ロイター, ビー, ウガルコビツク, ディ, & シュローダー, エイチ・シー, *J. Biol. Chem.* 265, 3803-3808 (1990)。
8. ギアダー, エム, エマーマン, エム, ソニゴ, ビー, クラベル, エフ, モンタグニア, エル, & アリゾン, エム, *Nature* 326, 662-669 (1987). (ヒト免疫不全ウィルス型 2 のゲノム構成およびトランス活性化)。
9. エマーマン, エム, ギアダー, エム, モンタグニア, エル, パルチモア, ディ, & ミューシング, エム・エイ, *EMBO J.* 6, 3755-3760 (1987). (ヒト免疫不全ウィルス型 2 トランスアクチベータの特異性はヒト免疫不全ウィルス型 1 のそれとは異なる)。
10. ロイ, エス, パーキン, エヌ・ティ, ローゼン, シー・エイ, イトビツチ, ジェイ, & ソネンベルグ, エヌ, *J. Virol.* 64, 1402-1406 (1990). (t a t によるヒト免疫不全ウィルス型 1 LTR 定方向遺伝子発現のトランス活性化のための構造的要素: t a t 応答配列における塩基対, ループ配列およびバルジの重要性)。
11. パークハウト, ビー・ジェーン, ケーティ, J. *Virol.* 63, 5501-5504 (1989). (ヒト免疫不全ウィルス型 1 のトランス活性化は, トランス作用応答ヘアピンの一本鎖バルジおよびループの双方に配列特異的である: 定量分析)。
12. セルビー, エム・ジェイ, ベイン, イー・エス, ルーシュ, ビー, & ビーターリン, ビー・エム, *Genes Dev.* 3, 547-558 (1989). (t a r のステムループの構造, 配列および位置は, HIV-1 LTR を介する t a t による転写的伸張を決定する)。
12. ハウバー, ジェイ & カリン, ビー・アール, *J. Virol.* 62, 673-679 (1988). (ヒト免疫不全ウィルス型 1 LTR のトランス活性化応答領域の変異分析)。
14. ジャコボビッツ, エイ, スミス, ディ・エイチ, ジャコボビッツ, イー, ビー & ケイバン, ディ・ジェイ, *Mol. Cell Biol.* 8, 2555-2561 (1988). (ヒト免疫不全ウィルス 1 (HIV-1) および HIV-2 mRNA 開始部位の離散要素 3' は, HIV トランスアクチベータによる転写的活性化を媒介する)。
15. ビーターリン, ビー・エム, ルーシュ, ビー・エイ, パール, ビー・ジェイ, & ウォーカー, エム・ディ, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 9734-9738 (1986)。
16. パークハウト, ビー, シルバーマン, アール・エイチ & ジーン, ケーティ, *Cell* 59, 273-282 (1989). (t a t は新生 RNA 鎖的を介してヒト免疫不全ウィルスをトランス活性化する)。
17. シャープ, ビー・エイ & マルシニアク, アール・エイ, *Cell* 59, 229-230 (1989)。
18. ジャコボビッツ, エイ, ローゼンタール, エイ & ケイバン, ディ・ジェイ, *EMBO J.* 9, 1165-1170 (1990)。
19. カリン, ビー・アール, *Cell* 46, 973-982 (1986)。
20. パークハウト, ビー, ガティグノル, エイ, シルバー, ジェイ, & ジーン, ケーティ, *Nucl. Acids. Res.* 18, 1839-1846 (1990)。
21. パーキン, エヌ・ティ, コーエン, イー・エイ, ダービュー, エイ, ローゼン, シー, ヘーゼルティン, ダブリュー & ソネンベルグ, エヌ, *EMBO J.* 7, 2831-2837 (1988)。
22. エグリー, アイ, パトリシ, アール, & ソネン

- ルグ, エヌ, *Cell* 56, 303-312 (1988)。
23. ライス, エイ・ビー, & マシューズ, エム・ビー, *Nature* 332, 551-553 (1988)。
24. ブラドック, エム, チャンパーズ, エイ, ウィルソン, ダブリュー, エスノーフ, エム・ビー, アタムズ, エス・イー, キングスマン, エイ・ジェイ, & キングスマン, エス・エム, *Cell* 58, 269-279 (1989)。
25. フェンリック, アール, マリム, エム・エイチ, ハウバー, ジェイ, リー, エス・ワイ, メイゼル, ジェイ & カリン, ビー・アール, *J. Virol.* 63, 5006-5012 (1989)。
26. モリス, シー・イー, クレメント, ジェイ・エフ & マクアリスカ, ダブリュー・ティ, *Gene* 41, 192-200 (1986)。
27. フェング, エス & ホランド, イー・シー, *Nature* 334, 165-168 (1988)。(HIV-1 tat トランス活性化はTAR内のループ配列を必要とする)。
28. ガルシア, ジェイ・エイ, ハリック, ディ, ソルタナキス, イー, ウー, エフ, ミツヤス, アール & ゲイナー, アール・ビー, *EMBO J.* 8, 765-778 (1989)。(転写の調節に必要とされるヒト免疫不全ウィルス型1LTR TATAおよびTAR領域配列)。
29. アダチ, エイ, ゲンデルマン, エイチ・イー, ケーニグ, エス, フォルクス, ティ, ウィリー, アール, ラブソン, エイ & マーティン, エム・イー, *J. Virol.* 59, 284-291 (1986)。
30. ゴーマン, シー・エム, バドマナブリアム, アール & ホワード, ビー・エイチ, *Science* 222, 551-553 (1983)。
31. ゴーマン, シー・エム, モファット, エル・エフ & ホワード, ビー・エイチ, *Mol. Cell Biol.* 2, 1044-1051 (1982)。
32. ウー, エイチ・エヌ & ウーレンベック, オー・シー, *Biochemistry*, 26, 8221-8227 (1987)。
33. ヒーフィ, エス, ディングウォール, シー, アーネベルグ, アイ, ゲイト, エム・ジェイ, グリーン, エス・エム, カーン, ジェイ, ロウ, エイ・ディ, シング, エムおよびスキナー, エム, *Cell* 60, 685-693 (1990)。(ウィルス粒子発現 (rev) タンパク質のHIV-1調節遺伝子は, rev応答元素領域内に置かれたRNAステムループ構造に結合する)。
34. デイリー, ティ・ジェイ, クック, ケイ・エス, ゲアリー, ジョ・エス, メイワム, ティ・イー & ルツシェ, ジェイ・アール, *Nature*, 342, 816-819 (1989)。(生体外でのHIV-1組換え rev タンパク質の rev 応答元素への特異的結合)。
35. レイボールド, イー・エイ, ラウンダノ, エイ, & ゴッテスマン, エム・イー, アドヒア, エス, & ダズ, エイ, *J. Mol. Biol.* 140, 57-75 (1980)。
44. アグラワル, エス, グッドチャイルド, ジェイ, シビエラ, エム・ビー, ソーントン, エイ・エイチ, サリン, ビー・エス, およびザメクニク, ビー・シー (1988)。
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 7079-7083。
45. プリル, ダブリュー・ケーティ, タング, ジェイ・ワイ, マー, ワー・エックスおよびケラザズ, エム・エイチ (1989), *J. Amer. Chem. Soc.*, 111, 2321-2322。
46. チャーング, ディ・エイおよびシャープ, ビー・エイ (1989) *Cell* 59, 789-795。(HIV rev による調節はスプライス部位の認識に依存する)。
47. コーラン, エイ・ダブリュー, チェン, シー・エイチおよびローゼン, シー・エイ (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 87, 1198-1202。(env mRNAにおける構造化された領域を有するヒト免疫不全ウィルス rev タンパク質の特異的相互作用)。
48. コノリリー, ビー・エイ, およびニューマン, ビー・シー, (1989) *Nucleic Acids Res.*, 17, 4957-4974。
49. コスティック, アールおよびバイル, ジェイ・エス
- ユー, ワイ, *Natl. Acids Res.* 18, 1819-1825 (1990)。
36. ゲイナー, アール, ソルタナキス, イー, クワバラ, エム, ガルシア, ジェイ, & シグマン, ディ・エス, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 4858-4862 (1989)。
37. ガティグノル, エイ, クマール, エイ, ラブソン, エイ, & ジーング, ケーティ, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 7828-7832 (1989)。
38. カオ, エス・ワイ, カルマン, エイ・エフ, ルーシュ, ビー・エイ, & ビーターリン, ビー・エム, *Nature* 330, 489-493 (1987)。(tat 遺伝子生産物によるHIV-1のLTR内の転写の抗終結)。
39. トゥーヒン, エム・ジェイ, & ジョーンズ, ケイ・エイ, *Genes Dev.* 3, 265-283 (1989)。
40. ラスピア, エム・エフ, ライス, エイ・ビー, & マシューズ, エム・ビー, *Cell* 59, 283-292 (1989)。(HIV-1 tat プロテインは転写の開始を増大し、伸張を安定化させる)。
41. バリク, エス, ゴッシェ, ビー, ウェイレ, ダブリュー, ラジンスキ, ディ, & ダズ, エイ, *Cell* 50, 885-899 (1987)。
42. ラジンスキ, ディ, グラザドジェルスカ, イー, & ダズ, エイ, *Cell* 59, 207-218 (1989)。

- (1989) (Tetrahedron Letters), 30, 4693-4696.
50. カリン, ビー・アール, フーバー, ジェイ, ケンペル, ケイ, ソドロスキ, ジェイ・ジ, ヘイゼルティン, グブリュー・エイおよびローゼン, シー・エイ (1988), J. Virol. 62, 2498-2501 (ヒト免疫不全ウイルストランス作用 *art* 遺伝子生産物の遺伝子場所)。
51. デイトン, イー・ティ, パウエル, ディ・エム, およびデイトン, エイ・アイ (1989), Science 246, 1625-1629. (CAR, HIV-1 の *rev* タンパク質のための標的配列の機能分析)。
52. エマーマン, エム, パソウ, アールおよびビーデン, ケイ (1989), Cell 57, 1155-1165. (ヒト免疫不全ウイルスの *rev* 遺伝子生産物はエンベロープ特異的 RNA 局在化に影響を及ぼす)。
53. ファインベルグ, エム・ビー, ジャレット, アール・エフ, アルドビニ, エイ, ガロ, アール・シーおよびウーグースター, エフ (1986), Cell 46, 807-817. (HTLV-III 発現および生産はウイルス RNA のスプライシングおよび翻訳のレベルでの複合体調節を含む)。
54. フェルバー, ビー・ケイ, ハドソボウロウクラダラス, エム, クラダラス, シー, コウブランド, ティおよびバブラキス, ジー・エヌ (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86, 1495-1499. (ヒト免疫不全ウイルス型 1 の *rev* タンパク質は、ウイルス mRNA の安定性および輸送に影響を及ぼす)。
55. ゲイト, エム, ジェイ, ジョーンズ, エイ・エスおよびウーカー, アール・ティ (1974) J. Chem. Soc. Perkin I, 1684-1686.
56. ゲイト, エム・ジェイ, ジョーンズ, エイ・エス, ジョーンズ, エム・ディ, シェファード, エム・ジェイおよびウーカー, アール・ティ (1979), J. Chem. Soc. Perkin I, 1389-1394.
57. ヘレン, シー, モンテネー・ガレスティア, ティ, セイソン, ティ, タカスギ, エム, トウルム, ジェイ・ジェイ, アセリン, ユー, ランセロット, ジー, マウリゾット, ジェイ・シー, トウルム, エフおよびソーング, エヌ・ティ (1985), Biochimie, 67, 777-782.
58. ジョーンズ, エイ・エス, (1979) Int. J. Biol. Macromolecules, 1, 194-207.
59. キム, エス, バーン, アール, グループマン, ジェイおよびボルチモア, ディ (1989) J. Virol. 63, 3708-3713. (ヒト免疫不全ウイルス感染中の DNA および RNA 合成の一時的局面: 特異的遺伝子発現の証拠)。
60. ナイト, ディ・エム, フローマーフェルト, エフ・エイおよびグレイブ, ジェイ (1987) Science 236, 837-840 (HIV の *art* / *tr* タンパク質の発現およびウイルスエンベロープ合成におけるその役割の研究)。
61. ラッグ, エイ, オレツカスカヤ, ティ・エス, ボルコフ, イー・エム, チェックス, ディ, シャバロウ, ゼット・エイおよびローゼンタール, エイ (1989) Nucleosides and Nucleotides, 8, 1473-1483.
62. ルメートル, エム, ベイヤード, ビーおよびブルー, ビー (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 648-652.
63. レッチンガー, アール・エル, ザング, ジー, サン, ディ・ケイ, イケウチ, ティおよびサリン, ビー (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 6553-6556.
64. マグ, エムおよびエンゲルス, ジェイ・グブリュー (1988) Nucleic Acids Res., 16, 3525-3543.
65. マリム, エム・エイチ, ホーバー, ジェイ, リ, エス・ワイ, メーゼル, ジェイ・ブイおよびカリン, ビー・アール (1989a) Nature (ロンドン) 338, 254-257. (HIV-1 *rev* タンパク質は構成された標的配列を介してスプライシングされないウイルス mRNA の核移出を活性化するように作用する)。
66. マリム, エム・エイチ, ボーンライン, エス, フェンリック, アール, リ, エス・ワイ, メーゼル, ジェイ・ブイおよびカリン, ビー・アール (1989b) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86, 8222-8226. (異なる重長鎖免疫不全ウイルス種によってコードされた *rev* タンパク質ベクターの機能的比較)。
67. マリム, エム・エイチ, ボーンライン, エス, ホーバー, ジェイおよびカリン, ビー・アール (1989c) Cell 58, 205-214. (HIV-1 *rev* タンパク質ベクターの機能的解析: *rev* 機能のトランス優勢抑制因子の誘導)。
68. マリム, エム・エイチ, ティリー, エル・エス, マッカーン, ディ・エフ, ルッシュ, ジェイ・アール, ホーバー, ジェイおよびカリン, ビー・アール (1990) Cell 60, 675-683. (HIV-1 構造の遺伝子発現はその RNA 標的配列への *rev* タンパク質ベクターの結合を必要とする)。
69. ミラー, ビー・エス, ドレオン, エヌ, パルフォード, エス・エムおよびマクパーランド, ケイ・ビー (1980) J. Biol. Chem., 255, 9569-9565.
70. ミラー, ビー・エス, チャンドラー・セイギャラン, エス, ドウ, ディ・エル, パルフォード, エス・エムおよびキム, エル・エス (1982) Biochemistry (Biochemistry), 21, 5468-5474.

71. ミラー, ビー・エス, ブレーク, ケイ・アール, クッシュマン, シー・ディ, ケーン, ジェイ・エム, リー, ビー・エル, リン, エス・ビー, およびムラカミ, エイ (1988) *Nucleic Acids Res. Special Pub. No.* 20, 113-114.

72. モーバン, エフ・レイナー, ビー, インバック, ジェイ・エル, テネット・エス, パートランド, ジェイ・アール, パオレッティ, ジェイ, マルビー, シーおよびパオレッティ, シー (1987) *Nucleic Acids Res.*, 15, 3421-3437.

73. オルセン, エイチ・エス, ネルブロック, ビー, コーレイン, エイ・ダブリュー, ローゼン, シー・エイ (1990) *Science* 247, 845-848. (二次構造は HIV rev タンパク質の RNA との相互作用の主要な決定因子である)。

74. ペローワルト, エル, アースライン, ユー, リベユ, シー, テュオング, エヌ・ティ, ビサーニ, イー, ジョバンナジェリ, シー, ル・ドアン, ティおよびヘレン, シー (1990) *Nature*, 344, 368-360.

75. ビッツィーリ, ジェイ・エイ, クラウチ, ティ, モロニー, エス・イーおよびベナー, エス・エイ (1990) *Nature*, 343, 38-37.

76. リムスキー, エル, ホーバー, ジェイ, デュコビッチ, エム, マリム, エム・エイチ, ラングルワ, エイ, カ

リン, ビー・アールおよびグリーン, ダブリュー・シー (1988) *Nature* (ロンドン) 335, 738-740. (HIV-1 rev タンパク質の HTLV-1 rex タンパク質による機能的置換)。

77. ローゼン, シー・アール, ターウィリング, イー, デイトン, エイ・アイ, ソドロウスキー, ジェイ・ジーおよびヘイズルティン, ダブリュー・エイ (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85, 2071-2075. (ヒト免疫不全ウィルスの遺伝子内シス作用性応答性配列)。

78. サディエ, エム・アール, ベンター, ティおよびウォン・スタール, エフ (1988) *Science* 239, 910-913. (HIV-1 の2つのトランス調節遺伝子 (tat-tII, trs) の部位特異的突然変異誘発)。

79. ソドロウスキー, ジェイ, ゴー, ダブリュー・シー, ローゼン, シー・エイ, デイトン, エイ, ターウィリング, イーおよびヘイズルティン, ダブリュー・エイ (1986) *Nature* (ロンドン) 321, 412-417 (HTLV-II 複製に必要とされる第2の転写後のアクチベータ遺伝子)。

80. スプロット, ビー・エス, レイモンド, エイ・アイ, ペイジャー, ビー, ニューナー, ビーおよびライダー, ユー (1989) *Nucleic Acids Res.*, 17, 3373-3386.

81. スタイン, シー・エイ, スパシング, シー, シノツカ, ケイおよびコーエン, ジェイ・エス (1988) *Nucleic Acids Res.*, 15, 3209-3221.

82. サン, ジェイ・エス, フランソワ, ジェイ・ジー, レイバリ, アール, セゾン・ベイモアラ, ティ, モンテネー・ガレスティア, ティ, テュオング, エヌ・ティおよびヘレン, シー (1988) *Biochemistry (Biochem. J.)*, 27, 6039-6045.

83. ブラッソフ, ブイ・ブイ, ゲイダマコフ, エス・エイ, ザリトバ, ブイ・エフ, クノール, ディ・ジー, ルビナ, エイ・エス, ニコナバ, エイ・エイ, ボダスト, エル・エムおよびフェドロバ, オー・エス (1988) *Gene*, 72, 313-322.

84. ザップ, エム・エルおよびグリーン, エム・アール (1989) *Nature* (ロンドン) 342, 714-716. (HIV-1 rev タンパク質による配列特異的結合)。

85. イケハラ, エム, オオツカ, イー, トクンガ, ティ, タニヤマ, ワイ, イワイ, エス, キタノ, ケイ, ミヤモト, ティ, オウギ, ティ, サクラガワ, ワイ, フジヤマ, ケイ, イカリ, ティ, コバヤシ, エム, ミヤケ, ティ, シバハラ, エス, オノ, エス, ウエダ, ティ, タナカ, ティ, ババ, エイチ, ミキ, エイチ, サクライ, エイ, オオイシ, ティ, チサカ, オーおよびマツバラ, ケイ (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 5956-5960.

86. スミシーズ, オー (1965) *Science*, 150, 1595-1598.

87. バックチャリヤ, エイ, マーキ, エイ・アイ・エイチ, およびリリー, ディ・エム (1990) *Nature*, 343, 484-487.

88. セルビー, エム・ジェー, ペイン, イー・エス, ルシェー, ビー, ビーターリン, ビー・エム. TAR におけるステムループの構造, 配列および位置は HIV-1 LTR によって tat による転写伸長を決定する. *Gene & Dev.* 1989, 3: 547-558.

89. ラスピア, エム・エフ, ライス, エイ・ビー, マシューズ, エム・ビー. HIV-1 tat およびアデノウイルス E1a の間の相乗作用は主に転写伸長の安定化による. *Gene & Development* 1990, 4: 2397-2408.

90. ブラッドック, エム, ソーバーン, エイ・エム, チャンバ, エイ, エリオット, ジー・ディ, アンダーソン, ジー・ジェイ, キングスマン, エイ・ジェイ, キングスマン, エス・エム. HIV-1 U3 領域によって課された各翻訳断片は tat-TAR 相互作用によってリリースされる. *Cell* 1990, 62: 1123-1133.

91. チン, ディ・ジェイ, セルビー, エム・ジェー, ビーターリン, ビー・エム. ヒト免疫不全ウィルス型 tat は核もしくは細胞質または重鎖細胞において成熟したトラン

ス作用性応答領域RNA種をトランス活性化しない。J. Virol. 1991, 65: 1758-1764.

92. ロイ エス、エイジー エム、ホバネシアン エイジー、ゾーネンバーグ エヌ、カツツエ エムジー。ヒト免疫不全ウィルス型1 tat 応答性構造RNAのステム構造の完全性はインターフェロン誘導された68, 000-M4プロテインキナーゼとの相互作用に必要とされる。1991, 65: 632-640.

93. ガネリー エス、ライス エイビー、ロバートソン エイチディ、マッシュューズ エムビー。HIV-1 TAR RNAはプロテインキナーゼDAIの活性化を防ぐことができる。Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990, 87: 8686-8691.

94. ディングウォール シー、エルンバーグ アイ、ゲイト エムジェイ、グリーン エスエム、ヒーフィ エス、カーン ジェイ、ローベ エイディ、シン エム、スキナ エムエイ。HIV-1 tatタンパク質はTAR RNA構造のステムにおいてUの豊富なバルジへの結合によって転写を刺激する。EMBO J. 1990, 9: 4145-4153.

95. コーディングリー エムジー、ラフェミア アールエル、キャラハン ビーエル、コンドラ ジェイエイチ、サルダナ ブイブイ、グラハム ディージェイ、ニュイアン ティエム、ルグローク ケイ、ゴットリブ エル、シュ

ラバック エイジェイ、コロノ アールジェイ。生体外のHIV-1のTAR配列とのtatおよびtatペプチドの配列特異的相互作用。Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990, 87, 8985-8989.

96. ウィークス ケイエム、アンベ シー、シュルツ エスシー、スタイツ ティエイ、クローザーズ ディエム。HIV-1 tatタンパク質のフラグメントはTAR RNAを特異的に結合する。Science 1990, 249: 1282-1285.

97. サウスゲート シー、ザップ エムエル、グリーン エムアール。不完全な84へつなされたHIV-1 tatタンパク質による転写の活性化。ザップ、エム・エルおよびグリーン、エム・アール(1989) Nature (ロンドン) 342, 714-716。(HIV-1 revタンパク質による配列特異的結合)。

別のタンパク質を介するRNA。Nature 1990, 345: 640-642.

98. セルビー エムジェイ、ピーターリン ビーエム。異種RNA結合タンパク質を介するHIV-1 tatによるトランス活性化。Cell. 1990, 62: 769-776.

99. パークハウト ビー、ガティニョール エイ、ラブソン エイビー、ジーング ケイティ。HIV-1 LTRのTAR-独立活性: tatがプロモータの特定

領域を必要とする証拠。Cell 1990, 62: 757-767.

100. オカモト ティ、ベンター ティ、ジョセフス エスジー、サディエ ジェイアール、ウォンスタール エフ。生体外のヒト免疫不全ウィルスのLTRからの転写活性化。Virology 1990, 177: 606-614.

101. マーシニャック アールエイ、カルナン ビージェイ、フランケル エイディ、シャープ ビーエイ。HIV-1 tatタンパク質は生体外における転写をトランス活性化。Cell 1990, 63: 791-802.

102. 「オリゴヌクレオチドおよびそれらの類似体: 実用的アプローチ」におけるゲート、エムジェイ、ブリッチャード、シーおよびスリム、ジー(1991)、エフ・エックスタイン(ed.)、オックスフォード・ユニバーシティ・プレス(Oxford University Press)、25-48.

103. サムナー・スミス、エム、ロイ、エス、バーネット、アール・ダブリュー、クーパーマン・アール、ライド、エル・エスおよびゾーネンバーグ・エヌ(1991) アブストラクツ・オブ・IUB・カンファレンス・オン・ヌクレイック・アシッド・セラピューティクス(Abstracts of IUB Conference on Nucleic Acid Therapeutics)、1991年1月13-17日、クリアウォーター・ビーチ、フロリダ、p94.

104. ミリガン、ジェイ・エフ、グローブ、ディ・アー

ル、ウィザレル、ジー・ダブリュー、およびユーランベック、オー・シー(1987) Nucleic Acids Res., 15, 8784-8799.

105. カターラ、ジーおよびブルーネル、シー(1990) Nucleic Acids Res., 18, 201.

106. ニコホロフ、ティ・ティ、コネリー、ビー・エイ(1991) Tetrahedron Lett., 32, 2505-2508.

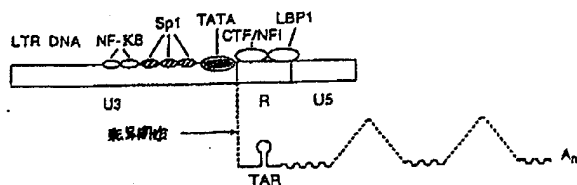
107. ニコホロフ、ティ・ティ、コネリー、ビー・エイ(1991) Tetrahedron Lett., 印刷中.

108. サリンジャー、ビー・エイ、ガラルド、エイチ・エフ、ウンガース、ジー・イーおよびギルボア、イー(1990) Cell 63, 601-608.

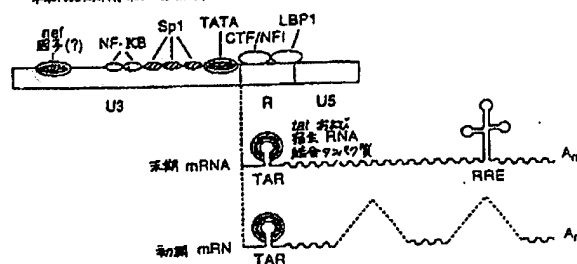
109. グラハム、ジー・ジェイ、マイヨ、ジェイ・ジェイ(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 5817-5821.

110. ディングウォール シー、エルンバーグ アイ、ゲイト エムジェイ、ヒーフィ エス、カーン ジェイ、およびスキナー エム。トランス活性化はTAR RNAへのHIV-1 tatタンパク質の結合を必要とする。アドバンシズ・フォー・AIDS (Advances for AIDS)、1991, 133-143.

1. 転写因子のLTRへの結合が、初期mRNAの基座にLTR転写を誘起する。



2. tat レベルが上昇し、転写を刺激する。初期mRNAは核から移出され、翻訳される。中期mRNAは核内に保持される。



3. rev レベルが上昇し、核からの初期mRNAの移出を刺激する。

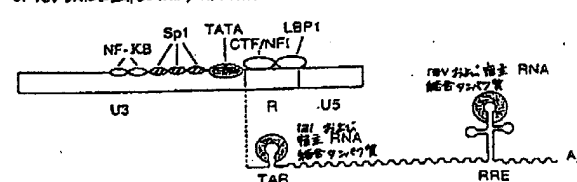


Fig. 1

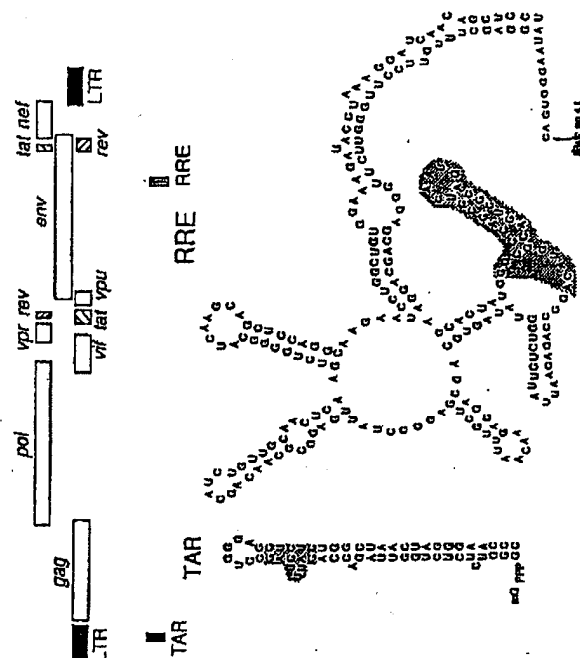


Fig. 2

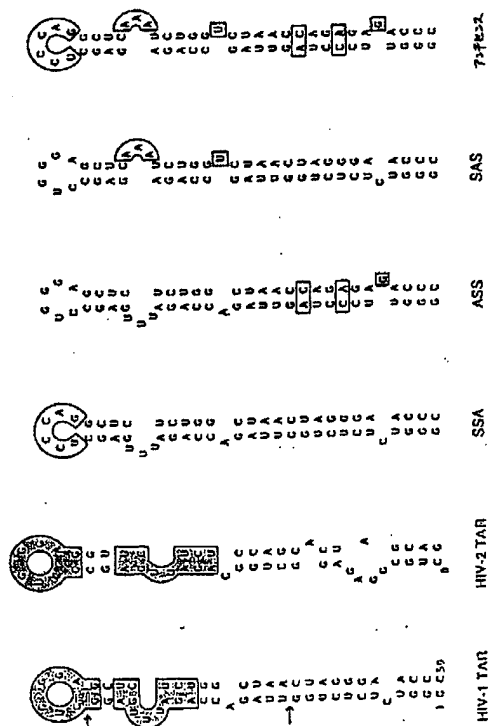


Fig. 3 Sheet 1

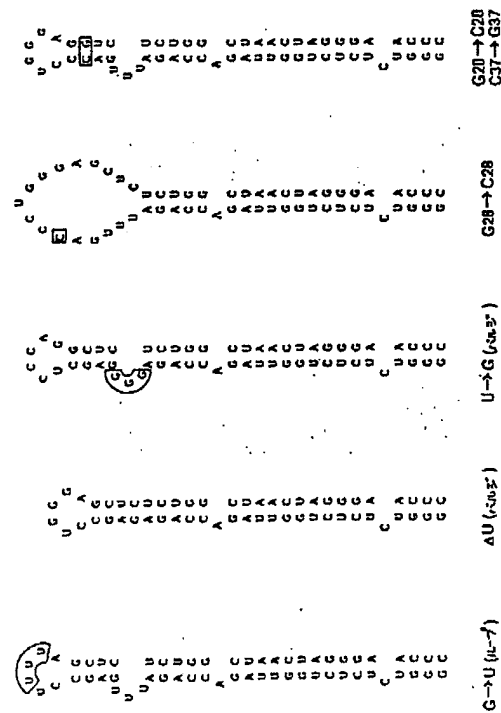
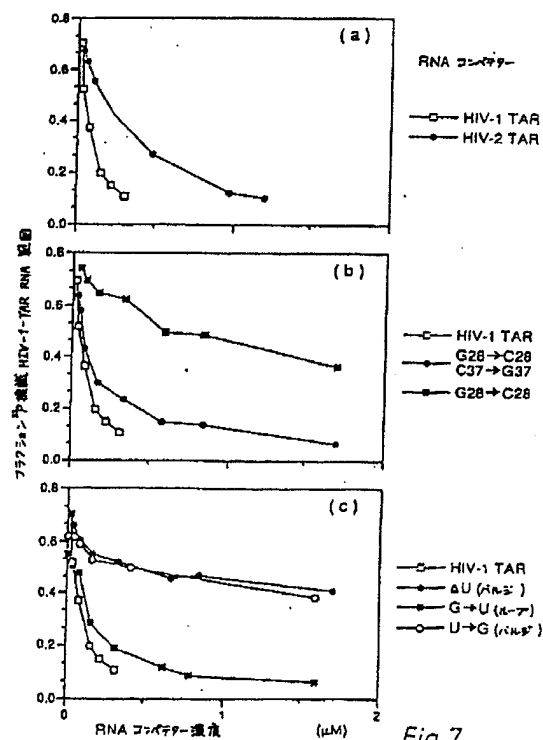
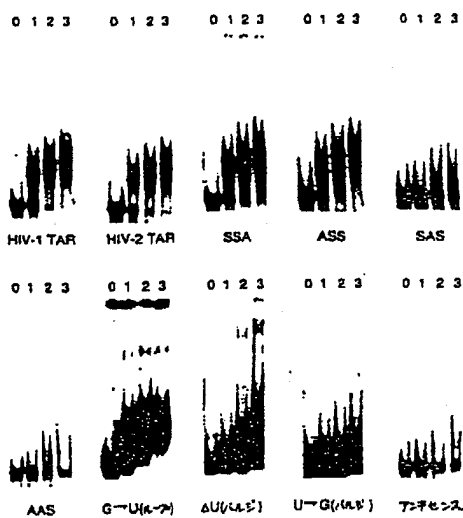
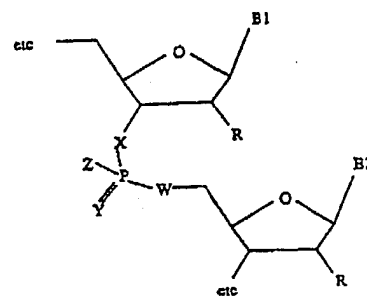
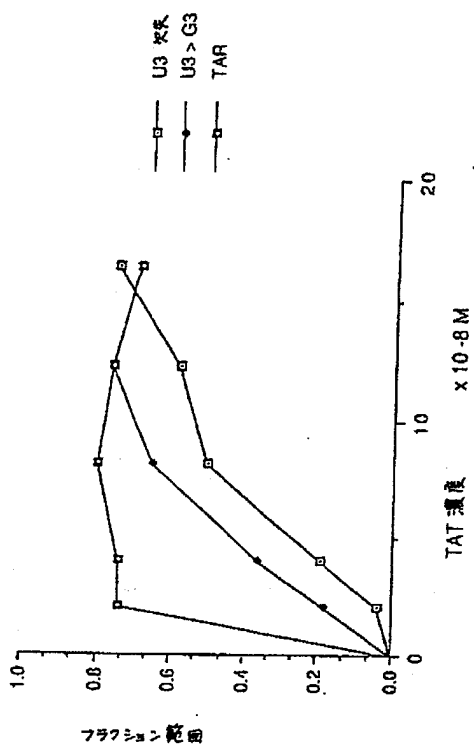


Fig. 3 Sheet 2



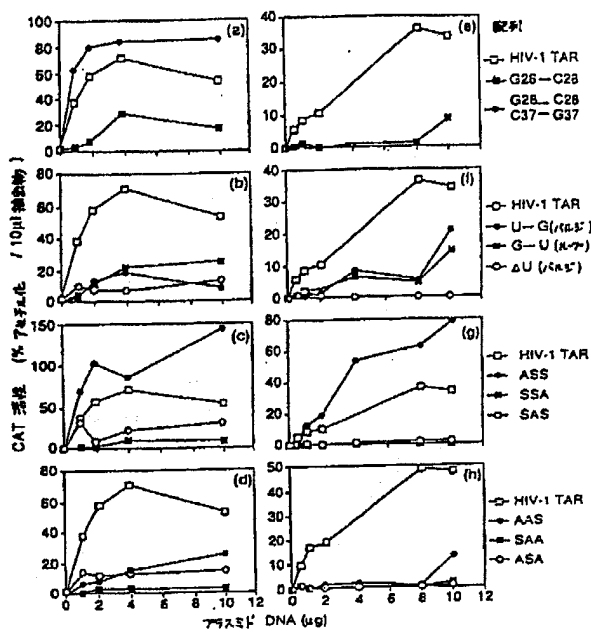


Fig. 8

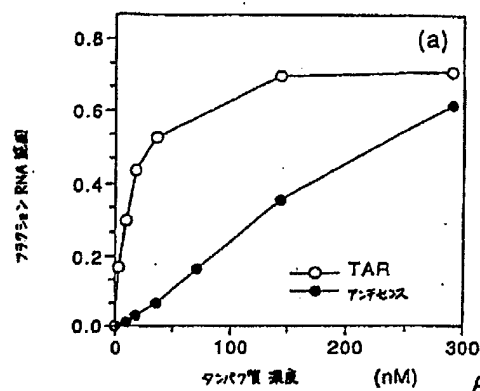


Fig. 9a

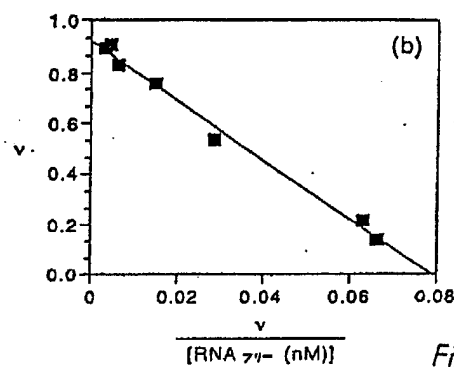


Fig. 9b

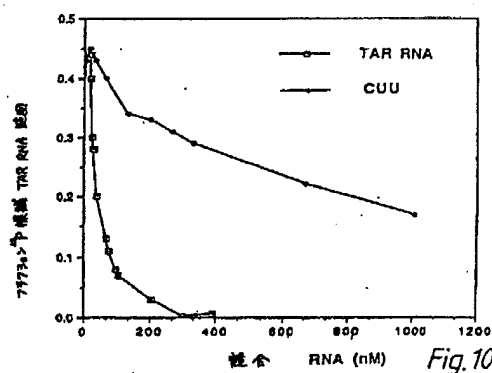


Fig. 10

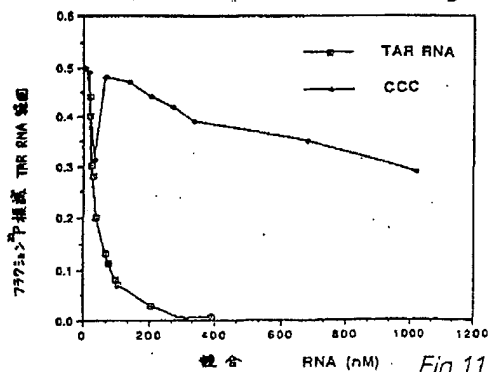


Fig. 11

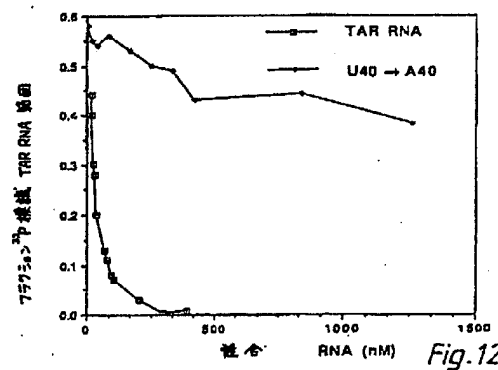


Fig. 12

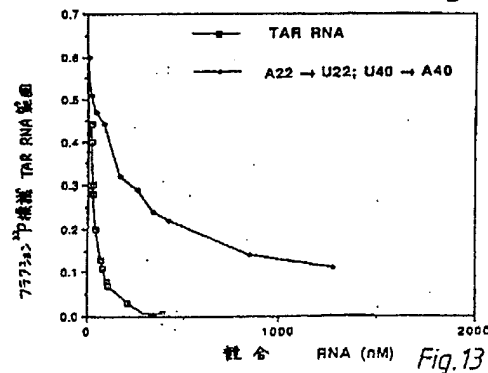
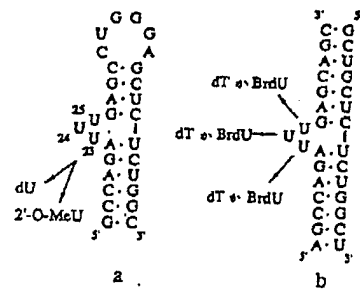
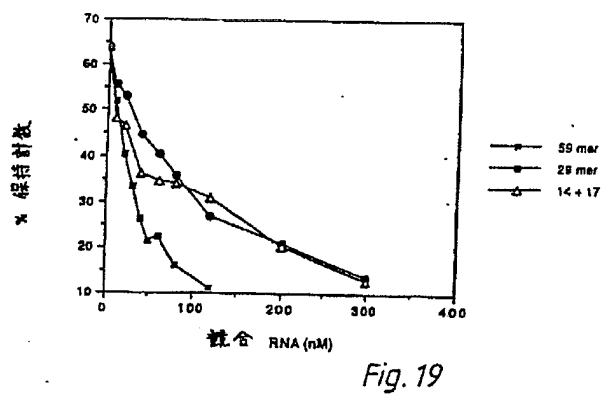
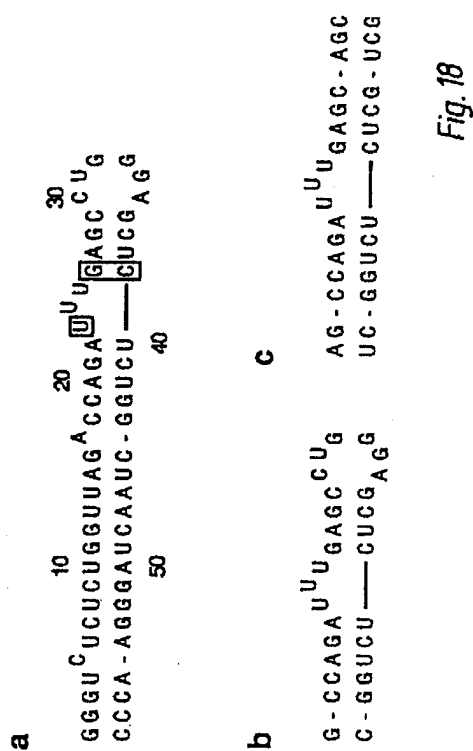
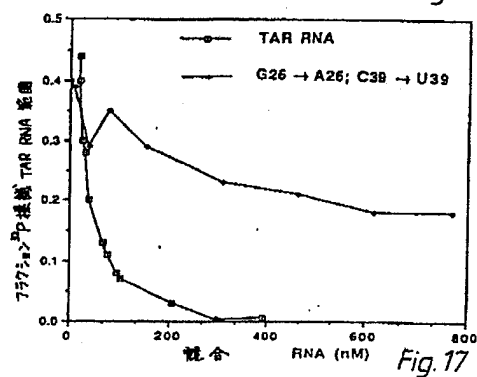
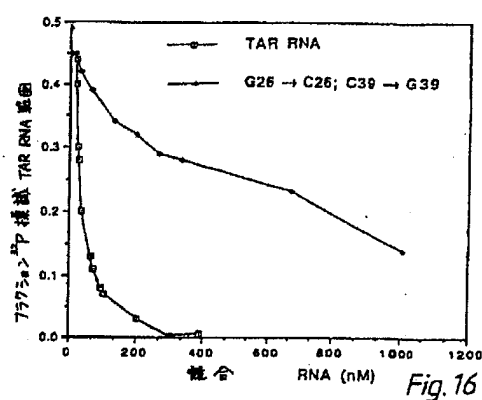
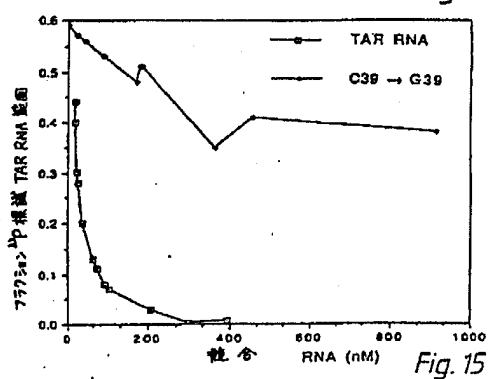
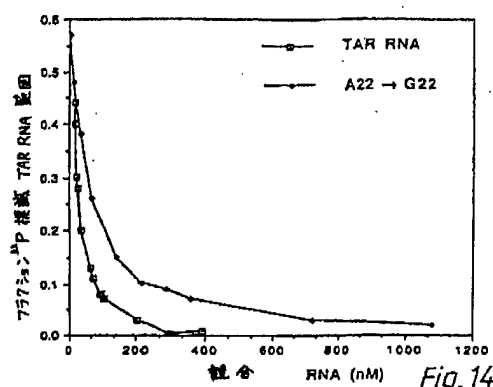


Fig. 13



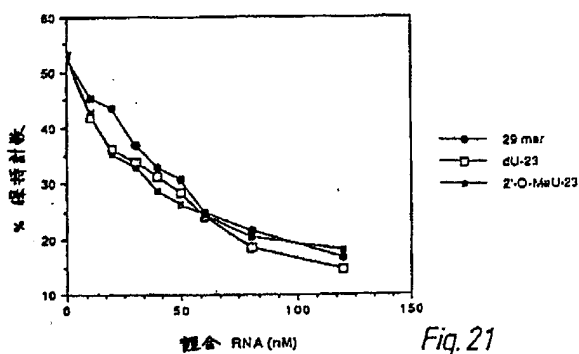


Fig. 21

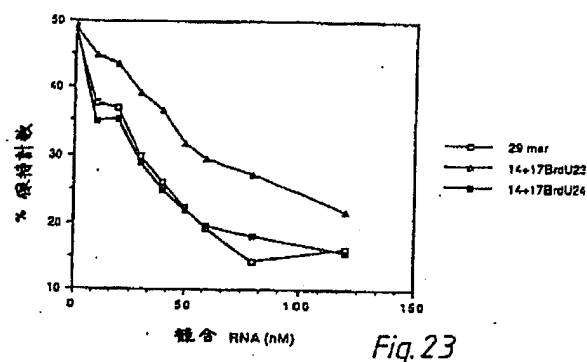


Fig. 23

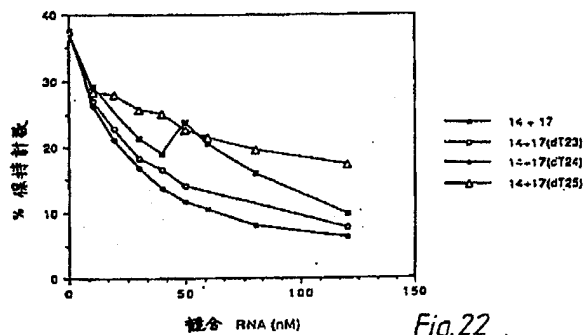


Fig. 22

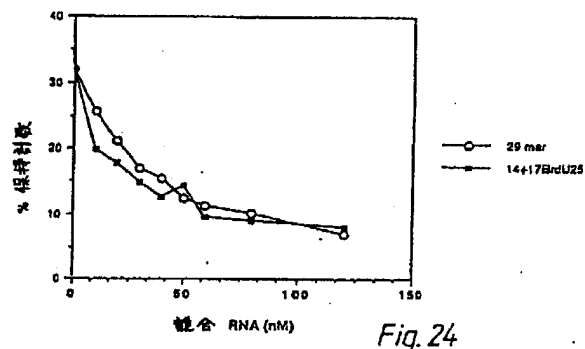


Fig. 24

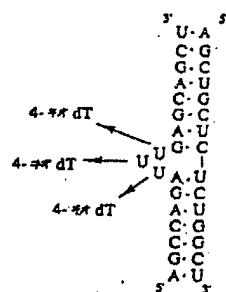


Fig. 25

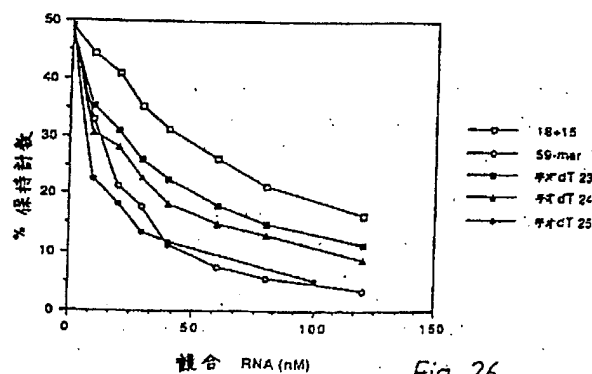


Fig. 26

補正書の写し（翻訳文）提出書（特許法第184条の8）

平成 5年 2月 2日

特許庁長官殿

1. 事件の表示
国際出版番号: PCT/GB91/01321

2. 発明の名称
ウィルス (HIV) 増殖抑制

3. 特許出願人
住 所 イギリス、ダブリュ・1・エヌ 4・エイ・エル、ロンドン、
パーク・クレセント、20
名 称 メディカル・リサーチ・カウンシル
代 表 者 ウッド、エム
国 籍 イギリス

4. 代理人
住 所 大阪市北区南森町2丁目1番29号 住友銀行南森町ビル
電話 大阪(06)361-2021
氏 名 弁護士 (6474) 深見 久 郎

5. 補正書の提出年月日
1992年 5月 8日

6. 添付書類の目録
補正書の写し（翻説文）

136

1に従った分子または請求項3に従った薬学的組成物を患者に投与するステップを含む、方法。

7. TAR RNAへのtatプロテインの結合を抑制する化合物を同定するための検定であって、化合物をtatプロテインおよび請求項1に従った分子と反応させることと、その分子へのtatの結合度を測定することを含む、検定。

8. 合成分子は長さにおいて20個の残基より長くないオリゴヌクレオチドからなる、前述の請求項のいずれか1つに記載の発明。

9. オリゴヌクレオチドは、HIV TAR RNAの配列におけるU₂₃に対応するウリジン残基を含む3つの不対残基を含むと共に、HIV TAR RNA配列におけるG₂₈-G₃₉に対応するフランキング塩基対を含む、前述の請求項のいずれか1つに記載の発明。

10. RNA結合配列はDNA配列に組込まれる、前述の請求項のいずれか1つに記載の発明。

11. その、または各オリゴヌクレオチドは、天然に存在するオリゴヌクレオチドであるか、修飾された塩基および/もしくは糖ならびに/または結合を有するオリゴヌクレオチドのような構造的に関連した変形物である、前述の請求項のいずれか1つに記載の発明。

12. その、または各オリゴヌクレオチドは1つ、またはそれより多い4-チオ-2'-デオキシシチジン残基の

国際調査報告

International Application No. PCT/GB 91/01321		
I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classifications apply, indicate any)		
According to International Patent Classification (IPC) or to any Special Classification (IPC) or to any Special Classification (IPC) or to any Special Classification (IPC)		
IPC: A 61 K 31/70, G 01 N 33/52, C 12 Q 1/70, G 01 N 33/559		
D. FIELD SEARCHED		
Classification System		
Classification System		
IPC: A 61 K		
Documents searched other than Abstracts of Inventions or the Abstracts of Inventions are indicated in Field Search Report		
II. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT?		
Category	Character of Document, with indication, where appropriate, of the relevant paragraph	Relevant to Claim No.
P, X	EP, A1, 0386963 (BAYER AG) 12 September 1990, see the whole document	1-6, 8-12
P, X	SCIENCE, vol. 249, 1990, Hiroaki Mitsuya et al: "Molecular Targets for AIDS Therapy", see page 1633 - page 1644 especially page 1536, column 2	1-6, 8-12
P, X	PROC. NATL. ACAD. SCI., vol. 87, 1990, Geoffrey J. Graham et al: "RNA transcripts of the human immunodeficiency virus transactivation response element can inhibit action of the viral transactivator", see page 5817 - page 5821 especially page 5821	1-6, 8-12
* Special categories of cited documents: "a" Documents published in the art which are not prior art for the purposes of the present invention; "b" Documents published in the art which are not prior art for the purposes of the present invention; "c" Documents published in the art which are not prior art for the purposes of the present invention; "d" Documents published in the art which are not prior art for the purposes of the present invention; "e" Documents published in the art which are not prior art for the purposes of the present invention; "f" Documents published in the art which are not prior art for the purposes of the present invention; "g" Documents published in the art which are not prior art for the purposes of the present invention; "h" Documents published in the art which are not prior art for the purposes of the present invention; "i" Documents published in the art which are not prior art for the purposes of the present invention; "j" Documents published in the art which are not prior art for the purposes of the present invention; "k" Documents published in the art which are not prior art for the purposes of the present invention; "l" Documents published in the art which are not prior art for the purposes of the present invention; "m" Documents published in the art which are not prior art for the purposes of the present invention; "n" Documents published in the art which are not prior art for the purposes of the present invention; "o" Documents published in the art which are not prior art for the purposes of the present invention; "p" Documents published in the art which are not prior art for the purposes of the present invention; "q" Documents published in the art which are not prior art for the purposes of the present invention; "r" Documents published in the art which are not prior art for the purposes of the present invention; "s" Documents published in the art which are not prior art for the purposes of the present invention; "t" Documents published in the art which are not prior art for the purposes of the present invention; "u" Documents published in the art which are not prior art for the purposes of the present invention; "v" Documents published in the art which are not prior art for the purposes of the present invention; "w" Documents published in the art which are not prior art for the purposes of the present invention; "x" Documents published in the art which are not prior art for the purposes of the present invention; "y" Documents published in the art which are not prior art for the purposes of the present invention; "z" Documents published in the art which are not prior art for the purposes of the present invention.		
III. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
4th November 1991		22 JAN 1992
International Searching Authority		Signature of Authorised Officer
EUROPEAN PATENT OFFICE		

International Application No. PCT/GB 91/01321		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category	Character of Document, with indication, where appropriate, of the relevant paragraph	Relevant to Claim No.
P, X	CELL, vol. 63, 1990, Bruce A. Sullenger et al: "Overexpression of TAR Sequences Renders Cells Resistant to Human Immunodeficiency Virus Replication", see page 601 - page 606 especially page 605 - page 606 (Discussion)	1-6, 8-12
A	CELL, vol. 63, 1990, Robert A. Marciniak et al: "HIV-1 Tat Protein Trans-Activates Transcription In Vitro", see page 791 - page 802	1-6, 8-12
A	GENES & DEVELOPMENT, vol. 3, 1989, Mark J. Selby et al: "Structure, sequence, and position of the stem-loop in tar determine transcriptional elongation by tat through the HIV-1 long terminal repeat", see page 547 - page 558	1-6, 8-12
A	NATURE, vol. 334, 1988, Sandy Feng & Eric C. Holland: "HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar", see page 165 - page 167	1-12

International Application No. PCT/GB 91/01321		
FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET		
V. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSUPPORTABLE		
This International Search Report has been prepared in respect of certain claims under Article 17(1)(a) for the following reasons:		
1. <input checked="" type="checkbox"/> Claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, 1000.		
2. <input type="checkbox"/> Claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949,		

FURTHER INFORMATION CONTINUED

- 1) Claims 1-6, 8-12. A synthetic molecule comprising at least one oligonucleotide comprising an RNA binding sequence corresponding to the site bound by the HIV protein tat and the use thereof in the manufacture of a medicament for inhibiting growth of HIV within cells.
- 2) Claim 7. An assay for identifying compounds that inhibit binding of tat protein to TAR RNA.

This document contains the abstract of the international application and the abstract of the invention. The abstract of the invention is not to be used for the purpose of determining the scope of the invention. The abstract of the invention is to be used for the purpose of determining the scope of the invention.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family (country)	Publication date
EP-A1- 0386563	12/09/90	DE-A- 3907562 JP-A- 2276577	11/09/90 12/11/90

For more details about this search, see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/90
EPO FORM P4779

Form PCT/GB

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵

// G 0 1 N 33/53

識別記号 庁内整理番号

D 8310-2 J

F I

(72) 発明者 ヒーフィイ, シャウン

イギリス, シー・ビー・1 3・アール・
エス, ケンブリッジ, レイドガンド・ロード,
76

(72) 発明者 ディングウォール, コリン

イギリス, シー・ビー・1 4・エル・ワ
イ, ケンブリッジ, チェリー・ヒントン,
コンウェイ・クロース, 5

特表平6-500012

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成11年(1999)3月23日

【公表番号】特表平6-500012

【公表日】平成6年(1994)1月6日

【年通号数】

【出願番号】特願平3-513229

【国際特許分類第6版】

C12N 15/09 ZNA

A61K 31/70 ADY

48/00 ABD

C12Q 1/68

G01N 33/15

33/566

【F I】

C12N 15/00 ZNA A

A61K 31/70 ADY

48/00 ABD

C12Q 1/68 Z

G01N 33/15 Z

33/566

手続補正書

平成10年 7月29日

特許庁長官様

1. 事件の表示

平成03年特許願第513229号



2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ファイバークラウド・ホールディングス・パブリック・リミテッド・カンパニー

3. 代理人

住所 〒530-0054
大阪市北区南森町2丁目1番29号
信友銀行南森町ビル
電話06-361-2021(代)
FAX 06-361-1731(代)

氏名 弁護士 (6474) 澤田 久郎



4. 補正命令の日付

広発(出願審決請求と同時に)

5. 補正により増加する請求項の数

2

6. 補正対象頁数

請求の範囲

7. 補正対象項目名

請求の範囲

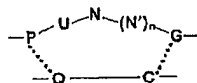
8. 補正の内容

請求の範囲を別紙のとおり補正する。

以上

請求の趣旨

1. 2つまたは3つの不対称基を含む、前記2つまたは3つの不対称基の3'側および5'側の両端には少なくとも1つの塩基が隣接しており、前記隣接する塩基の一方は塩対とフランキンギン基対を形成しており、前記不対称基はHIV TAR RNA配列中の U_{12} に相当するウリジン残基を含む、前記フランキンギン塩基対の1つはHIV TAR RNA中の C_{44} ・ C_{50} 塩基対に相当するG・C塩基対であり、該塩基以下の塩対の一本鎖分枝である、核酸分枝。
2. 2つの別個の鎖を含む、前記2つの鎖のうち第1の鎖は2つまたは3つの不対称基を含む、前記2つまたは3つの不対称基の3'側および5'側の両端には少なくとも1つの塩基が隣接しており、前記隣接する塩基の一方は、前記2つの鎖のうちの第2の鎖にある塩対およびフランキンギン塩基対を形成しており、前記不対称塩基はHIV TAR RNA配列中の U_{12} に相当するウリジン残基を含む、かつ前記フランキンギン塩基対の1つはHIV TAR RNA中の C_{44} ・ C_{50} 塩基対に相当するG・C塩基対である、核酸分枝。
3. HIV-tatタンパク質のTAR結合部位に利用して、HIV TARと融合する塩酸分枝であった。



の棋造を含み、ここで、

- N は i または j であり、
 N は任意のヌクレオチドであり、
 N' は任意のヌクレオチドであり、かつ
 P と Q は塩基対の形成が可能なヌクレオチドである。核酸分子、
 4. H I V t e t r a n u c l e o t i d e 型の T A R 結合部位に対して、H I V
 する核酸分子であって、核酸配列
 $5' - P - C - N - (N') - (N') - G - 3'$ と $3' - Q - C - 5'$

のアニオンリングにより形成され、ここで、

- NはOまたはIであり、
 Nは任意のステレオチドであり、
 Pは任意のステレオチドであり、かつ
 PとQは塩基対を形成するメレンチドである。核酸分子、
 5. Pはアダニンであり、かつQはウリジンである。請求項4に
 記載の核酸分子、
 6. Rは2であり、Nはウリジンまたはイソシチンであり、かつN'はウリジンで
 ある。請求項3から5のいずれか1項に記載の核酸分子、
 7. $\cdots P-U-N-(N')\cdots C-G$ 配列および $\cdots Q-C$ 配列が、別個の核酸
 鎖中に存在する。請求項3から6のいずれか1項に記載の核酸分子、
 8. $\cdots P-U-N-(N')\cdots C-G$ 配列および $\cdots Q-C$ 配列が、一本の核酸
 鎖中に存在する。請求項3から6のいずれか1項に記載の核酸分子、
 9. 修飾された塩基および/または結合および/または糖を含む。請求項1から
 8のいずれか1項に記載の核酸分子、
 10. インビデでの修飾が添加するよう変更されている。請求項1から8のい
 ずれか1項に記載の核酸分子、
 11. 請求項1から10のいずれか1項に記載の核酸分子を含む医薬組成物、
 12. (a) タンパク質のTAR RNAへの結合を阻害する化合物を向還する
 ためのアッセイと; かつ、(a) 請求項1から10のいずれか1項に記載の核酸
 分子とともに (a) タンパク質をインキュベートする工程と、(b) 前記核酸
 分子にお合される: a) タンパク質の量を測定する工程とを含む、実験用化合物
 の存在下での前記TAR RNAへのタンパク質の結合が阻害化合物の
 存在下での結合に対して減少することが阻害剤である。アッセイ、
 13. 医薬として使用するための請求項1から10のいずれか1項に記載の核酸
 分子、
 14. H1Vの複製を阻害するための医薬の製造における請求項1から10のい
 ずれか1項に記載の核酸分子の使用、